

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivica Jaklinović

Morfometrijska analiza mnogooke puzavice
(*Polycelis felina* Daly.) nakon tretiranja aluminijem

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj rad, izrađen u Zoologijskom zavodu, pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Kovačevića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Goranu Kovačeviću, prof. dr. sc. Mirjani Kalafatić, dr. sc. Gordani Gregorović i gđi. Nadici Vincek na pomoći u izradi ovog rada.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

MORFOMETRIJSKA ANALIZA MNOGOOKE PUZAVICE (*POLYCELIS FELINA*
DALY.) NAKON TRETIRANJA ALUMINIJEM

Ivica Jaklinović
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Istraživan je učinak aluminijske u laboratorijskim uvjetima na planariju *Polycelis felina* (Daly.). Planarije su tretirane s 21 koncentracijom aluminijskog sulfata okta-dekahidrata u trajanju od pet dana i uspoređene s tri kontrolne skupine. Korištene su mikroskopijske, histološke i morfometrijske metode. Rezultati su pokazali različite morfološke promjene na tijelu planarija kao i promjene u ponašanju: različite depigmentacije, poremećaje u pokretanju, uvrtnje pojedinih dijelova tijela, sporo reagiranje na mehanički podražaj, kontrakcije tijela i mortalitet. Histomorfometrijskom analizom pokazane su promjene u veličini i broju neoblata, retikularnih stranica kao i promjene u epitelnim stanicama i segmentima epitela, parenhimu i mišićnom sloju. Pri koncentraciji od 200 mg AL/L planarije su počele pokazivati blage, ali značajne promjene. Koncentracija 600 mg AL/L pokazala se prijelaznom koncentracijom prilikom koje su uočene intenzivne subletalne promjene u ponašanju, te morfološkoj i histološkoj strukturi virnjaka. Koncentracija 1100 mg AL/L dovela je do ireverzibilnih promjena i LC₅₀. Sniženi pH u kontrolnih skupina nije izazvao promjene. Uzimajući u obzir visoki LC₅₀, korištene koncentracije ne predstavljaju stvarnu prijetnju populacijama virnjaka u prirodnom okolišu, nego pokazuju opseg mogućih poremećaja i oštećenja u okolišu s potencijalno visokim koncentracijama aluminijske.

(44 stranice, 16 slika, 7 tablica, 84 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: toksičnost, aluminij, morfometrija, planarije, morfološke i histološke promjene, oporavak

Voditelj: Dr. sc. Goran Kovačević, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Goran Kovačević, doc.

Dr. sc. Božena Mitić, red. prof.

Dr. sc. Mirjana Pavlica, red. prof.

Rad prihvaćen: 14. 09. 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

MORPHOMETRICAL ANALYSIS OF THE PLANARIAN *POYCELIS FELINA* DALY. AFTER TREATMENT WITH ALUMINIUM

Ivica Jaklinović
Rooseveltova trg 6, HR-10 000 Zagreb, Croatia

The effect of aluminium on planarian *Polycelis felina* (Daly.) in laboratory conditions was studied. The planarians were treated with 21 concentration of aluminium sulphate for five days and compared to 3 control groups of animals. Microscopical, histological and morphometric methods were used. The results showed distinguished morphological changes on the planarian body as well as behavioral changes: various depigmentations, disordered locomotion, twisting of the body parts, hardly reacting to the mechanical stimuli, body contractions and mortality. Histomorphometric analyses showed changes in the size and number of neoblasts and reticular cells. Changes in epithelial cells and segments, parenchyma and muscular layer were also noticed. At 200 mg AL/L planarians started to show mild, but significant changes. Concentration of 600 mg AL/L presented concentration threshold with distinct changes in behavior, morphological and histological structure of planarians. Concentration of 1100 mg AL/L caused irreversible changes and LC₅₀. Lowered pH did not cause changes in control groups. Considering high LC₅₀, the used concentrations of aluminium presented no actual environmental threat to planarian populations in nature, but showed the extent of disturbances and damages in a possible concentrated Al-environment.

(44 pages, 16 figures, 7 tables, 84 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Keywords: toxicity, aluminium, morphometry, planarians, morphological and histological changes, recovery

Supervisor: Dr. Goran Kovačević, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Goran Kovačević, Asst. Prof.

Dr. Božena Mitić, Prof.

Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Thesis accepted: 14. 09. 2011.

1. UVOD**1.1. Aluminij**

1.1.1. Opće karakteristike aluminija	1
1.1.2. Učinak aluminija na organizme	2

1.2. Biologija slatkovodnih virnjaka

1.2.1. Sistematika i ekologija	4
1.2.2. Morfologija i histologija	4
1.2.3. Razmnožavanje i regeneracija	8
1.2.4. Planarije kao test organizmi	9

1.3. Morfometrija.....10**1.4. Cilj istraživanja11****2. MATERIJAL I METODE****2.1. Test organizmi i tretman aluminijem12****2.2.. Izrada histoloških preparata14****2.3. Histološka i morfometrijska analiza15****2.3. Statistička analiza16****3. REZULTATI****3.1. Morfološke promjene**

3.1.1. Depigmentacije i deformacije	17
3.1.2. Lokomotorne promjene.....	19
3.1.3. Mortalitet.....	20

3.2. Histološke promjene i morfometrija.....21**4. RASPRAVA.....30****5. ZAKLJUČAK36****6. LITERATURA37**

Al - aluminij

AL - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (aluminijev sulfat oktadekahidrat)

D_M - debljina mišićnog sloja

cpc - broj stanica po koncentraciji (*cells per concentration*)

mpc - broj mjerenja po koncentraciji (*measurements per concentration*)

N_N - broj neoblasta

NOEC – neopaziva efektivna koncentracija (*No Observed Effect Concentration*)

N_R - broj retikularnih stanica

OP - oporavak

P_E - površina epitelnih stanica

P_N - površina neoblasta

P_O - površina odsječka epitela

P_R - površina retikularnih stanica

1.1 Aluminij

1.1.1 Opće karakteristike aluminija

Prema rasprostranjenosti u Zemljinoj kori aluminij je s 8,8 % najrasprostranjeniji metal i treći najučestaliji element, odmah iza kisika i silicija. Usprkos tome, u prirodi se nikad ne pojavljuje kao elementarna tvar nego je vezan u različitim spojevima. Najveće količine aluminija nalaze se u raznim alumosilikatima kao što su tinjci i glinenci. U ionskom stanju i spojevima aluminij ima oksidacijsko stanje +3. Elementarni aluminij je mekani, lagani metal srebrno bijele boje. Dobar je vodič električne struje, na površini lako oksidira i s mnogim metalima stvara legure. Za industrijsko dobivanje u najvećoj mjeri koristi se ruda boksit. Aluminij se koristi u pakiranju prehrambenih artikala, kao strukturalni metal u autoindustriji, građevinarstvu, elektroindustriji, u proizvodnji antacida, aditiva, vakcina, antiperspiranata, eksploziva itd. Aluminijeve soli često se koriste pri tretiranju vode zbog veće količine organske tvari, mikroorganizama, neželjenog mirisa ili mutnoće (ATSDR 1992; Filipović i Lipanović 1991). Usprkos tome količine aluminija u ljudskom organizmu su vrlo male (Yokel i McNamara 2001).

Aluminij se prirodno nalazi u tlu, vodi i zraku, a u okoliš se oslobađa prirodnim procesima ili zbog ljudske djelatnosti. U zraku ga, u obliku suspendiranih sitnih čestica (prašine), u prosjeku ima od 0,0005 do 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ovisno o lokaciji, vremenskim uvjetima i razini industrijalizacije. U vodi približno neutralnog pH koncentracija aluminija obično varira od 0,001 do 0,05 mg/L, ali se podiže do 0,5 - 1 mg/L u kiselijim vodama ili vodama bogatim organskim tvarima. Na ekstremno kiselim vodama zahvaćenim umjetnim zakiseljavanjem razine otopljenog aluminija mogu porasti i do 90 mg/L (WHO 1997). Dozvoljena koncentracija aluminija u vodi u Hrvatskoj iznosi 0,150 mg/L. Najveća dopuštena koncentracija aluminija u stolnim vodama iznosi 0,2 mg/L (NN 92/09).

Iako ga u zemljinoj kori ima puno koncentracija aluminijevih iona u površinskim vodama je niska zahvaljujući njegovoj slaboј topljivosti u neutralnim medijima. Zakiseljavanjem, zalučivanjem kao i u prisustvu nekih kompleksnih liganada njegova topljivost raste pa se počinje ispuštati iz sedimenta povećavajući i koncentraciju. Topljivost Al^{3+} je najmanja pri pH 6,2 (Yokel i McNamara 2001). U otopinama

manjeg pH od 5 aluminij dolazi kao oktahedralni heksahidrat $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Al^{3+}). Kako otopina postaje sve manje kisela $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ se deprotonira preko $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ i $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ do tetrahedralnog aluminat-iona $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ tj. $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Martin 1986). Aluminijev ion (Al^{3+}) je toksični oblik aluminija jer je optimalno velik i ima pogodan naboj da supstituira neke biološki značajne katione kao što su Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} te osobito Mg^{2+} na enzimima i regulacijskim mjestima u stanici (Cowburn i sur. 1990; Macdonald i Martin 1988).

1.1.2. Učinak aluminija na organizme

Aluminij u živim organizmima postoji u više različitih formi kao: slobodni ion, kompleks male molekularne mase i povezan u makromolekularne komplekse. Slobodni Al^{3+} se lako veže za mnoge supstance i strukture, i njegova količina ovisi o afinitetu prema pojedinim ligandima, njihovoj količini i metabolizmu. Aluminij može stvoriti i komplekse male molekularne mase s organskim kiselinama, amino kiselinama, nukleotidima, fosfatima i ugljikohidratima koji uz popriličnu stabilnost pokazuju i veliku metaboličku aktivnost. Velik dio aluminija u organizmima može biti reverzibilno vezan s proteinima, polinukleotidima i glukozaminoglikanima. Ti kompleksi su manje metabolički aktivni od kompleksa s malom molekularnom masom. Aluminij može stvoriti i komplekse s makromolekulama koji su toliko stabilni da su veze praktički ireverzibilne kao što je to slučaj s makromolekulama jezgre i kromatina (Ganrot 1986).

Kod životinja i ljudi aluminij u najvećoj mjeri djeluje na kosti, hematopoetski sustav te posebice na središnji živčani sustav (Cannata Andía 2000; Jeffery i sur. 1996; Strong 1996).

Neki od neurotoksičnih efekata aluminija mogu biti djelomično objašnjeni pomoću subcelularnog i genotoksičnog učinka na DNA u neuronima i drugim stanicama kao što je pokazano u testovima *in vitro*. Oni uključuju procese kao što je vezanje na fosfate i dušićne baze u DNA, povećanje vezanja histona i DNA, učinak na sestrinske kromatide i smanjivanje dijeljenja stanice. Citoplazmatski efekti, iako nisu specifično utjecani interakcijama aluminija s DNA, uključuju konformacijske promjene u kalmodulinu i povećanoj intracelularnoj koncentraciji kalcija pa značajno utječu i na funkcije neurona i drugih stanica (Bertholf 1987).

Čovjek dnevno u prosjeku kroz hranu i vodu u organizam unese oko 5 mg aluminija. Apsorpcijska rata preko probavila je obično manja od 1 %. Smatra se da je najvažniji način apsorpcije aluminija pasivnom difuzijom kroz paracelularne prostore. Na apsorpciju utječu i različiti ligandi koji je mogu inhibirati ili ubrzati. Apsorbiran, aluminij se širi u većinu organa i akumulira uglavnom u kostima. Sposoban je premostiti krv-mozak barijeru te ući i u fetus. Najvažniji način ekskrecije kod ljudi i sisavaca je putem urina (Greger i Sutherland 1997; Sutherland i Greger 1998; WHO 1997; Yokel i McNamara 2001).

Smatra se da izlaganje aluminiju predstavlja rizični faktor za razvoj ili ubrzavanje neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, amiotrofna lateralna skleroza i Parkinsonova bolest kod ljudi (Perl i Pendlebury 1986; Yokel 2000 Yoshimasu i sur. 1980). Iako postoje još mnoge nedoumice, dio istraživanja podržava ideju da aluminij nije glavni uzročni faktor u nastanku Alzheimerove bolesti, nego da ima ulogu u razvoju kao kofaktor u lancu patoloških događaja koji njome rezultiraju (Flaten 2001). Izlaganje aluminijevim solima kroz prehranu dovelo je i do pojave poremećaja u ponašanju laboratorijskih životinja, ali bez naznaka jasnih znakova encefalopatija ili neurohistopatologije (Conor i sur. 1988).

Nema dokaza da bi aluminij pokazivao mutageni i kancerogeni učinak bilo na bakterije, bilo na stanice sisavaca *in vitro* (Schroeder i Mitchener 1975; WHO 1997)

Brojni testovi toksičnosti na životinjama su pokazali da aluminij dovodi do promjena u ponašanju, različitih morfoloških i histoloških promjena kao i do mortaliteta (Amonette i sur. 2003; Calevro i sur. 1998; Kovačević i sur. 2007B, Kovačević i sur. 2009; Poleo i Hytterød 2003).

1.2. Biologija slatkovodnih virnjaka

1.2.1. Sistematika i ekologija

Puzavice ili planarije su slobodno živeći organizmi sistematizirani u koljeno Platyhelminthes - plošnjaci, razred Turbellaria - virnjaci i red Tricladida - trocrijevci. Mogu se naći u velikim količinama u oligotrofnim planinskim tokovima i jezerima, u vodama bogatim kisikom s rasponom temperature od 6 - 15 °C. Osjetljive su na organska onečišćenja i povišenu temperaturu. Svi virnjaci su karnivori. Puzavice se hrane sitnim kolutićavcima, ličinkama kukaca i mekušaca. Negativno su fototaksične i danju se skrivaju u mulju, ispod kamenja, otpalog lišća i polomljenih grana drveća u skupinama od šest do dvadeset jedinki (Lock i Reynoldson 1976; Matonićkin i sur. 1998; Roca i sur. 1992).

Polycelis felina (Daly.) mnogooka puzavica (Slika 1.), široko rasprostranjena euroazijska vrsta, svrstana je u porodicu Planariidae.



Slika 1. *Polycelis felina* (Daly.).

Preuzeto s <http://picasaweb.google.com/lh/photo/fM2EhnohNWJ5TCafYzMWVA>

1.2.2. Morfologija i histologija

Puzavice su kao i svi virnjaci dorzoventralno spoljoštene i bilateralno simetrični acelomati shizocelnog tipa (nemaju prave tjelesne šupljine jer im je ona u potpunosti ispunjena tkivom mezodermalnog porijekla) bez čvrstog skeleta i crijevnog otvora. Dugačke su od 0,5 do 15 mm. Trbušna strana obično je ravna, a leđna su malo

nadsvođena. Prednji dio tijela, glava, jasno je razlučen od ostalih dijelova. Na glavi se obično nalaze aurikule, mali bočni izdanci koji sadrže velik broj receptora, te manji ili veći broj jednostavnih očiju pomoću kojih u većini slučajeva ne mogu stvarati sliku. Epiderm je jednoslojan, bez kutikule i djelomično trepetljivak. Leđna strana obično je bez trepetljika. Epiderm sadrži velik broj tamnih pigmentnih stanica - melanofora. U epidermu ili u mezodermalnom parenhimu virnjaka postoji puno žlijezdanih stanica koje su često skupljene zajedno zbog obavljanja posebnih funkcija. Takve su i adhezivne žlijezde koje se nalaze na rubu trbušne strane tijela a izlučuju sluz koja omogućuje životinji da se pričvrsti za predmet i olakša si kretanje. Žlijezdane stanice izlučuju i tijela, rabdoide, različitog oblika: rabdite koji su kratki i malo savinuti, ramnite koji su dugački, tanki i malo savinuti te hondrociste koji su veliki rabdoidi. Kad se rabdoidi izbace iz tijela razgrađuju se u sluz kojom se životinja obavije i na taj način se zaštiti od predatora ili nepovoljnih uvjeta. Veličina rabdoida ovisi o starosti jedinke i kod starijih životinja su malo veći nego kod mlađih (Wrona 1986).

Mišići sloj se nalazi ispod epiderma i bazalne membrane. Izgrađen je od vanjskog sloja prstenastih i unutrašnjeg sloja longitudinalnih mišića. Osim njih postoje i parenhimska mišićna vlakna u gotovo svim smjerovima, a najčešći su dorzoventralni i horizontalno orijentirani mišići. (Baguñà i Ballester 1978; Morita i Best 1984A).

Čitav unutrašnji prostor shizocela, ispod mišićnog sloja i bazalne membrane, ispunjen je parenhimom mezodermalnog porijekla - mezenhimom - koji osim kao potporno tkivo ima značajnu ulogu u metabolizmu životinje i spremanju glikogena i drugih tvari. Mezenhim je kod nekih virnjaka ispunjen stanicama, a inače je to sincitijalna spongiozna tvorevina s šupljinama koje su ispunjene tekućinom, pa služi i kao hidroskelet. U mezenhimu se nalazi puno slobodnih ameboidnih stanica, velikih retikularnih stanica i malih neoblata (Matonićkin i sur. 1998).

Retikularne stanice u svojoj citoplazmi imaju vidljive brojne glikogenske granule, lipidne kapljice i nešto lizosoma te ih je lako razlikovati od drugih tipova stanica. One migriraju u oštećeno tkivo, prekrivaju ozlijeđeni mezenhim i fagocitiraju ostatke oštećenih stanica. Retikularne stanice također mogu prepoznati i strane čestice ili organizme kao što su bakterije. Manji agregati bakterija su fagocitirani, a veći su obavijeni retikularnim stanicama i odvedeni do probavila. Ako se u virnjake implantira ekstrahirana stanična stijenka bakterija retikularne stanice kasnije reagiraju

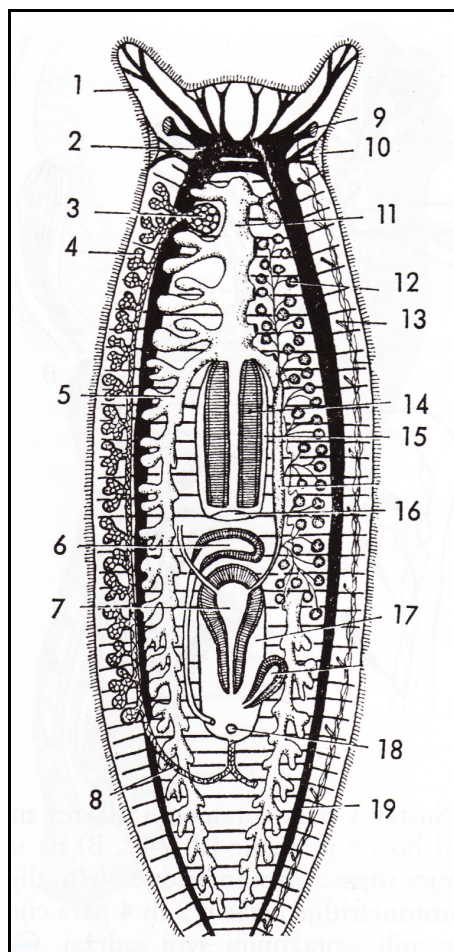
brže i snažnije pokazujući da imaju mogućnost stanične imunološke memorije. Kad se virnjaci podvrgnu učinku kancerogenih tvari - koji izazivaju leukemiju ili limfome sisavaca - dolazi do razvoja retikuloma, što pokazuje sličnost između krvnih stanica sisavaca i retikularnih stanica virnjaka. Kada se takve tumorske stanice implantiraju u zdravog domaćina retikularne stanice domaćina ih napadaju što je još jedan od pokazatelja da su retikularne stanice primitivne krvne stanice i imaju važnu ulogu u transportu nutrijenata, homeostatskoj kontroli stanica i u obrambenim i imunološkim mehanizmima (Morita 1991; Morita 1995).

Neoplasti su malene, okrugle ili ovalne stanice koje se intenzivno boje bazičnim bojama. Imaju vrlo malo citoplazme u kojoj se nalaze brojni ribosomi i mali endoplazmatski retikulum. Velik dio stanice im zauzima jezgra u kojoj je dobro razvijena i vidljiva jezgrica. Mitohondriji su uobičajene veličine i učestalosti (Auladell i sur. 1993; Baguñà i Romero 1981; Morita i Best 1984B; Sakai-Wada i Mukaidani 1985; Spiegelman i Dudley 1973). Neoplasti su jedine totipotentne stanice u virnjaka i sposobne su se diferencirati tijekom čitavog života jedinke. U tijelu puzavica ih ima i do 25 - 30 % od ukupnog broja stanica (Baguñà 1981; Baguñà i Romero 1981). Slični su matičnim stanicama sisavaca kao što s hematopoetske stanice i mutacije njihove DNA dovode do razvoja tumora i različitih abnormalnosti (Hansen i sur 1993.).

Probavni sustav virnjaka počinje ustima koja se otvaraju na trbušnoj strani. Na usta se nastavljaju dugačko mišićavo ždrijelo i slijepo crijevo čija se stijenka sastoji od jednog sloja fagocitnih gastrodermalnih stanica između kojih su smještene žlijezdane stanice (Bowen i sur. 1974). Oblik crijeva je značajno determinacijsko svojstvo. Mnogooka puzavica je je trocrijevni virnjak i ima tri crijevna ogranka, jedan anteriorno i dva posteriorno, s mnogo proširenja. Kod hranjenja obično obaviju plijen i pomoću ždrijela iz njega isišu tkiva, organe i tjelesne tekućine. Neprobavljeni ostaci izbacuju se kroz usta (Slika 2.).

Za izmjenu plinova ne postoji poseban sustav pa se oni prenose difuzijom. Pretpostavlja se da epidermalna trepetljivost pridonosi prozračivanju i apsorpciji.

Virnjaci su amoniotelični organizni i za izlučivanje imaju protonefridijalni sustav izgrađen od cijevi i vršnih pramenih glavica koji se na površinu otvara s jednim, dva ili više nefridiopora (Ryder i Bowen 1974).



Slika 2. Shema građe trocrijevne puzavice. 1 - aurikula, 2 - mozak, 3 - jajnik, 4 - žumančana vreća, 5 - posteriorna grana crijeva, 6 - bursa kopulatriks, 7 - kopulatorni organ, 8 - cijev za prolaz jaja i žumanjka, 9 - oko, 10 - aurikulna jamica, 11 - anteriorna strana crijeva, 12 - sjemeni mjehurić, 13 - ekskrecijski otvor, 14 - ždrijelo, 15 - ždrijelni džep, 16 - otvor ždrijelnog džepa, 17 - atrium genitale, 18 - spolni otvor, 19 - trbušna živčana vrpca. Preuzeto iz Matoničkin i sur. (1998).

Virnjaci su najjednostavnije životinje kod kojih je zamjetna cefalizacija (Villar i Schaeffer 1993). Mozak je sastavljen od dva cerebralna ganglija koja su povezana širokim komisurama. Od moždanog ganglija izlaze parni osjetni živci prema aurikulama i očima, te parna trbušna živčana vrpca prema stražnjem dijelu tijela (Slika 2.). Komisure povezuju živce, živčane vrpce s perifernim živčanim sustavom, kojeg čine subepidermalna i submuskularna živčana mreža koje se uglavnom sastoje od završetaka senzornih i motornih neurona ispod epiderma i mišićnog sloja, te gastrodermalne živčane mreže smještene ispod gastrodermalne bazalne membrane. Živčane stanice virnjaka slične su živčanim stanicama kod drugih životinja i one mogu biti unipolarne, bipolarne i multipolarne (Baguñà i Ballester 1978; Matoničkin i sur. 1998). Živčani sustav ima i ulogu primitivnog endokrinog sustava pa luči

neurotransmitere kao što su acetilkolin, serotonin, GABA (gama aminomaslačna kiselina) te druge različite neuropeptide (Cebrià 2007).

Osjetilne stanice često su rasprostranjene po čitavoj površini tijela, najgušće na prednjem dijelu tijela, osobito na aurikulama, malenim bočnim izdancima na glavi. Ponekad su mehanoreceptori na aurikulama skupljeni u obliku posebnog organa za dodir. Na jaki mehanički podražaj virnjaci obično reagiraju negativno, a na slabi pozitivno. Kemoreceptori su uglavnom ograničeni na pojedine dijelove glave, dobro su razvijeni i pomoću njih planarije nalaze hranu. Za primanje podražaja o brzini strujanja vode i orijentaciju u vodenoj struji služe im reoreceptivne stanice koje su raspoređene sa strane tijela. Statocisti, organi za ravnotežu se nalaze kraj mozga. Oči su najčešće tipa pigmentnih čašica i kod puzavica mogu biti raspoređena po čitavoj dorzalnoj strani. Na svjetlo je osjetljivo čitavo tijelo (Matonićkin i sur. 1998).

Citološka analiza jedinki vrste *Polycelis felina* (Daly.) pokazala je da one imaju 18 kromosoma ($2n = 18$) (Kalafatić i sur. 2004B).

1.2.3. Razmnožavanje i regeneracija

Virnjaci su hermafroditi, uz vrlo malo iznimaka. Imaju potpune muške i ženske rasplodne organe koji mogu biti posve odvojeni, svaki sa svojim spolnim otvorom, ili se mogu spojiti terminalno. Zbog unutrašnje oplodnje imaju kopulatorne organe (Slika 2.). Samooplodnja nije zabilježena kod slatkovodnih puzavica, a vjerojatno je nema ni kod trocijevaca i mnogocijevaca. Oplodena jaja puzavica skupljaju se u čahurom obavijene nakupine koje se izlučuju kroz atrijalni dio sustava. Kod nekih puzavica kopnenih voda nastaju dvije vrste jaja: Ljetna jaja koja su obavijena tankim ovojem i razvijaju se relativno brzo te zimska jaja s debljim ovojem, koja su otpornija prema isušanju i nižim temperaturama. Prije razvoja postoji i dulja faza mirovanja. Razvoj jaja uglavnom je izravan i samo kod mnogocijevaca postoji metamorfoza. Brazdanje je determinirano (sudbina svake stanice je određena za vrijeme njezine izgradnje) i spiralno jer blastomere nisu neposredno jedna iznad druge nego su zakrenute (Matonićkin i sur. 1998).

Virnjaci imaju i sposobnost nespolnog razmnožavanja poprečnom binarnom diobom te veliku moć regeneracije. Osim fiziološke regeneracije, koja je manjeg opsega i uključuje obnavljanje oštećenih stanica i tkiva, virnjaci su sposobni i za reparativnu regeneraciju koja uključuje ponovnu izgradnju organa i dijelova tijela (Villar i

Schaffer 1993). U regeneraciji virnjaka najveću ulogu imaju neoblasti i retikularne stanice. Dok retikularne stanice fagocitiraju oštećene i dotrajale stanice neoblasti se diferencijacijom razvijaju u nove koje ih zamjenjuju (Morita i Best 1984B).

Roca i sur. (1992) su pokazali da se u povoljnim uvjetima okoliša češće razmnožavaju spolno, a u nepovoljnim nesporno. Podijeljena ili presječena jedinka brzo se regenerira i prijašnji prednji dio razvije novi stražnji kraj, a prijašnji stražnji dio razvijati će novu glavu (Benazzi i Benazzi-Lentati 1983). I sami komadići različitih dijelova tijela su sposobni potpuno regenerirati životinju, ali je najveći uspjeh iz dijelova neposredno iza glave i s posteriornog kraja tijela. Najmanje dimenzije tkiva koje omogućuju regeneraciju do normalnih jedinki su od 0,08-0,16 mm³ (Mead i Krump 1986). Za uspješnu regeneraciju oštećenih dijelova velik značaj ima živčani sustav (Villar i Schaffer 1993).

Ako planarije gladuju, apsorbiraju svoje unutrašnje organe i to najprije zrela jaja, zatim žumanjčane vreće, rasplodne organe, parenhim, crijevo i naposljetku mišiće. Ako se izgladnjeloj životinji da hrana, ona regenerira izgubljene organe i dostigne prijašnju veličinu (Matonićkin i sur. 1998).

1.2.4. Planarije kao test organizmi

Planarije pokazuju osnovne sličnosti s višim životinjama u biokemijskoj, fiziološkoj i staničnoj organizaciji. Osjetljive su na niske koncentracije okolišnih toksikanata, promjene uzrokovane toksikantima su relativno brze, jasno vidljive i odražavaju reakcije slične onima u viših životinja. Također su sposobne za ksenobiotičnu biotransformaciju koja nalikuje biotransformaciji monooksigenazama u sisavaca i mogu se koristiti kao optimalne indikatorske vrste za kvalitetu voda (Tehseen i sur. 1992). Vrlo ih je lako sakupiti u velikom broju, jednostavno ih i jeftino održavati stoga su česti test organizmi u različitim istraživanjima: u fiziologiji (Lange 1967), ekologiji (Lock i Reynoldson 1976) testovima toksičnosti pesticida (Kalafatić i sur. 2001; Kalafatić i sur 2003; Milić-Štrkalj i Kalafatić 1997), akvatičkoj toksikologiji (Franjević i sur. 2000A; Franjević i sur. 2000B; Kalafatić i sur. 2004A; Kalafatić i Tomašković 2000), teratogenosti i kancerogenosti pojedinih pripravaka (Guecheva i sur. 2001; Schaeffer 1993), ali i u etologiji, psihologiji i drugim područjima (Abramson i sur. 1996; Best 1965).

1.3. Morfometrija

Morfometrija je metoda mjerenja različitih morfoloških struktura i oblika od pojedinih dijelova stanica i staničnih organela do organa, pa i čitavih organizama. Strukture je moguće brojiti, mjeriti im dužinu, širinu, površinu, stereološkom analizom odrediti volumen i površinu membrana na temelju mjerenja na dvodimenzionalnim presjecima te velik broj drugih fizičkih karakteristika. Danas se morfološka mjerenja najčešće obavljaju pomoću kvalitetnog mikroskopa, odgovarajućih dodataka kao što su digitalne kamere te prikladnih računalnih programa koji omogućuju kvantitativnu analizu slike.

Morfometrija omogućuje kvantitativnu analizu i preciznu usporedbu različitih struktura i tkiva, a uz računalnu i statističku analizu dodatno je smanjena mogućnost osobnih pogrešaka, kao i pogrešaka zbog različitih interpretacija riječima opisanih rezultata (Bookstein 1989; Lohmann 1983).

Morfometrijska mjerenja se često koriste u biologiji u istraživanju fosila (Ciampaglio i sur. 2001; Foote 1991; Lohmann 1983), u botanici kao pomoćna metoda pri taksonomiji (Krishna Swamy i sur. 2004; Tornadore i sur. 2004), u istraživanjima simbiotskih odnosa (Kovačević i sur. 2007A, Kovačević i sur. 2009), u istraživanju različitih beskralješnjaka (Baron i sur. 2004; Mariappan i Balasundaram 2004) i kralješnjaka (Barańska i sur. 1997; Parr i sur. 1993). Morfometrijske analize česte su i u biomedicinskom znanostima npr. kod histopatoloških istraživanja kao metoda za dijagnostiku nekih tumora (Waldemarin i sur. 2004).

1.4. Cilj istraživanja

Svrha ovog istraživanja je primjenjujući morfometrijske metode, specifičnu histokemijsku metodu bojenja (Kovačević i sur. 2006) usporediti učinak različitih koncentracija aluminija na stanice i tkiva mnogooke puzavice kao test organizma, posebice odrediti učinak na opće morfološke karakteristike, osnovne promjene ponašanja poput poremećaja u lokomociji, odrediti LC_{50} i postojanje potencijalnih akumulacija (depozicija) aluminija u tkivima, osobito u živčanom tkivu, te ih morfometrijski obraditi. Uz određivanje akutnog učinka aluminija, cilj je bio i odrediti sposobnost regeneracije virnjaka s obzirom na nastala oštećenja.

Sa zakiseljavanjem raste topivost aluminija u vodama, a s topivošću i mobilnost aluminijevih iona, što pojačava i njegov toksični učinak (Macdonald i Martin 1988). Zbog toga se u kiselim sredinama koncentracije otopljenog aluminija mogu povisiti i uzrokovati različite efekte u akvatičkim organizmima i kopnenim biljkama (WHO 1997). Kako otapanje aluminijevog sulfata oktadekahidrata potiče opadanje pH otopine, jedan od ciljeva ovog istraživanja također je bio pokazati utječe li i pH, uz aluminij, na morfološke i morfometrijske promjene.

2.1 Test organizmi i tretman aluminijem

U pokusu su korištene jednike vrste *Polycelis felina* (Daly.) skupljene u potoku blizu Gračanskog ribnjaka u Zagrebu. U laboratoriju su držane u aeriranoj akvarijskoj vodi sljedećeg ionskog sastava: Cl^- 23,86 mg/L, NO_2 <0,03 mg/L, NO_3 20,357 mg/L, NH_3 <0,02 mg/L, P <20 $\mu\text{g/L}$, F^- 78 $\mu\text{g/L}$, SO_4^{2-} 27,127 mg/L, K^+ 2,163 mg/L, Na^+ 12,058 mg/L, Ca^{2+} 24,681 mg/L, Mg^{2+} 24,681 mg/L, Al^{3+} 10,7 $\mu\text{g/L}$. Držane su u hladnjaku na temperaturi od 8 °C u posudi volumena jedne litre. Hranjene su jednom tjedno svježom maceriranom pilećom jetrom. Sat vremena nakon hranjenja uklonjeni su ostaci hrane i promijenjena je voda. Sljedeći dan voda je promijenjena još jedanput kako bi se uklonili eventualni ostaci probave. Tjedan dana prije početka i za vrijeme trajanja eksperimenta virnjaci nisu bili hranjeni. Za eksperiment su izabrane jedinke uobičajene morfologije i podjednake duljine (10 - 12 mm) koje su podijeljene u 24 skupine po 20 životinja i stavljene u staklene posude volumena 70 ml, visine 3,5 cm i širine 5,5 cm. Dvadeset i jedna skupina je tretirana s vodenim otopinama aluminijevog sulfata oktadekahidrata ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, Kemika, Zagreb) sljedećih koncentracija: 25, 100, 120, 180, 200, 250, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1400 i 1500 mg/L. U Tablici 1. prikazana je ovisnost pH otopine o koncentraciji otopljenog AL u izabranim skupinama za morfometriju.

Tablica 1. pH vrijednosti otopina obrađenih morfometrijom; $t = 21,6^\circ\text{C}$

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (mg AL/L)	pH
200	6,14
600	5,32
1100	3,85

Tri kontrolne skupine planarija stavljene su u aeriranu akvarijsku vodu bez dodatnih količina aluminija zbog usporedbe s tretiranim životinjama. pH vode kontrolnih skupina iznosio je 7,7 u prvoj (negativna kontrola), 5,32 u drugoj (prva pozitivna kontrola) i 3,85 u trećoj posudi (druga pozitivna kontrola), a reguliran je dodavanjem 0,1 M H_2SO_4 (Tablica 2.). Nakon petodnevnog izlaganja učinku aluminija virnjaci su kapaljkom prebačeni u akvarijsku vodu kako bi se pratio oporavak koji je trajao pet

dana. Mortalitet, morfološke promjene kao i promjene ponašanja promatrane su stereo lupom. Pokus je ponavljan tri puta.

Tablica 2. pH vrijednosti otopina kontrolnih skupina; $t = 21,6\text{ }^{\circ}\text{C}$

Kontrolne skupine	pH
1 (negativna kontrola)	7,7
2 (1. pozitivna kontrola)	5,32
3 (2. pozitivna kontrola)	3,85

2.2. Izrada histoloških preparata

Za histološku i morfometrijsku analizu izabrani su virnjaci tretirani s 200, 600 i 1100 mg AL/L, te virnjaci iz prve kontrolne skupine (pH = 7,7). Po 10 virnjaka iz odabranih skupina nakon tretmana AL, kao i nakon razdoblja oporavka i iz prve kontrolne skupine je fiksirano 24 sata u Bouinovom fiksativu - smjesi zasićene vodene otopine pikrinske kiseline, formalina i ledene octene kiseline u omjeru 15:5:1. Nakon fiksacije jedinke su isprane u 70 % etanolu te dehidrirane kroz seriju etanola - poslije 30 minutnog dehidriranja u 80 % etanolu, jedinke su dehidrirane 30 minuta u 96 % a zatim i dva puta po 30 minuta u apsolutnom etanolu iz kojeg su prebačene na 30 minuta u kloroform te u drugi kloroform u kojem su stajale do sljedećeg dana. Drugi dan virnjaci su na temperaturi od 60 °C u termostatu uronjeni pola sata u smjesu parafina s kloroformom u omjeru 1:1, nakon čega su tri puta po 30 minuta uklapani u nove taline parafina, te prebačeni u papirne ladice. Obrađeni parafinski blokovi medijano su rezani mikrotomom (Shandon Finesse 325, Thermo) na 6 µm debele prereze, koji su zalijepljeni na predmetna stakalca premazana bjelančevinastim glicerinom - smjesom bjelanjka jajeta i glicerina. Deparafiniranje prereza počinje uranjanjem u dvije posude s ksilolom po 15 minuta u svakoj od njih. Nakon ksilola preparati su uranjani po pet minuta u etanolnu seriju opadajuće koncentracije - iz apsolutnog etanola u 95 %, zatim u 80 % i naposljetku u 75 % otopinu alkohola - te isprani u destiliranoj vodi. Prerezi su bojani prema Pearseu (1976) i prilagođeno prema Kovačeviću i sur. (2006) 16 minuta s 0,2 % kiselim eriokrom cijaninom ($C_{23}H_{15}Na_3O_9S$) koji je dobiven otapanjem 0,2 g boje u 100 mL otopine 1 % HCl. Prije bojanja nastala otopina je profiltrirana. Obojeni preparati su odmah ispirani u toploj prema vrućoj tekućoj vodi do pojavljivanja karakteristične svjetle sivo-plave boje, nakon čega su kratko isprani u 1 % kiselom etanolu dobivenim miješanjem 100 ml 70 % etanola i 1 mL koncentrirane HCl, pa trenutno prebacivani (desetak sekundi) kroz rastuću seriju etanola (75 %, 80 %, 96 %, apsolutni etanol), te kratko kroz dvije posude sa ksilolom.

Tako obojeni i dehidrirani preparati su uklopljeni u Canada balsam i ostavljeni na sušenju kroz dva tjedna.

2.3. Histološka i morfometrijska analiza

U histološkoj analizi korišten je Nikon Eclipse E600 svjetlosni mikroskop s instaliranom kamerom Nikon DXM 1200. Morfometrijska mjerenja obavljena su na povećanju od 400x pomoću računalnog programa Lucia G verzija 4.81 na po pet slučajno odabranih i fotografiranih mikroskopskih vidnih polja za svaki parametar i koncentraciju. Mjereni su broj i površina retikularnih stanica i neoblata, površina epitelnih stanica, površina epitelnog sloja na odsječku od 100 μm i širina mišićnog sloja. Broj neoblata i retikularnih stanica dobiven je prebrojavanjem svih jasno vidljivih retikularnih stanica i neoblata na po pet vidnih polja. Njihova površina kao i površina epitelnih stanica mjerena je (μm^2) na uzorku od po 200 stanica po koncentraciji (cpc). Širina mišićnog sloja dobivena je mjerenjem 40 nasumično izvršenih mjerenja po koncentraciji (mpc), a površina odsječka epitela (μm^2) na 100 μm ($\pm 5 \mu\text{m}$) mjerenjem na 5 mpc. Sve dobivene vrijednosti u tretiranoj skupini i u oporavku su uspoređene s kontrolom.

2.4. Statistička analiza

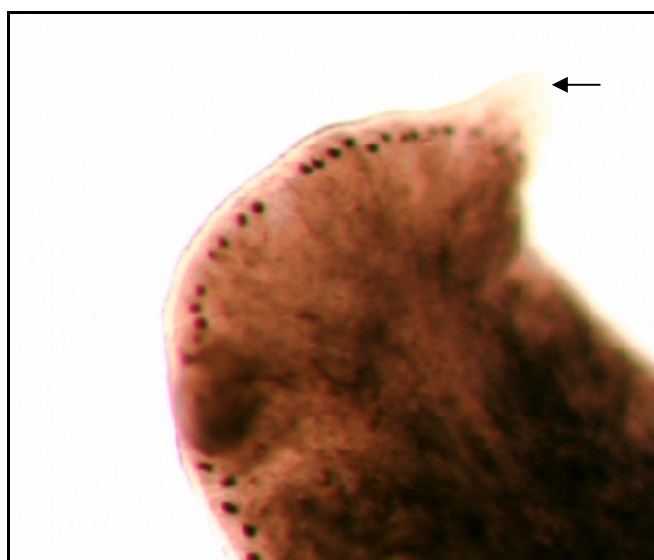
Izračun srednjih aritmetičkih vrijednosti i standardnih devijacija obavljen je pomoću Microsoft Office Excel 2003. Svi parametri predstavljeni su kao prosjek odnosno srednja aritmetička vrijednost i standardna devijacija mjerenja. Prosjek (\bar{x}) je računat kao kvocjent zbroja svih podataka određenog svojstva ($\sum x_i$) u skupini s ukupnim brojem podataka (N) odnosno $\bar{x} = (\sum x_i) / N$. Standardna devijacija (sd) je dobivena prema sljedećoj formuli: $sd = \sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2 / (N - 1)]}$.

Statistička značajnost razlike procijenjena je t-testom pomoću programa STATISTICA 7.1, $p < 0,05$.

3.1. Morfološke promjene

3.1.1. Depigmentacije i deformacije

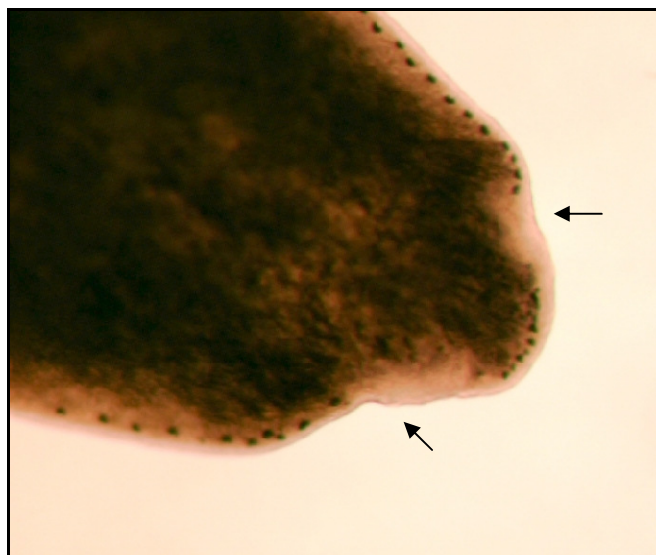
Tijekom petodnevnog tretiranja aluminij je doveo do različitih morfoloških promjena, promjena u ponašanju i lokomociji kao što su: depigmentacije (Slika 3.), različite manje ili veće lezije aurikula i glave (Slika 4.), poremećaji lokomocije, deformacije, zavijanja pojedinih dijelova tijela, slabe reakcije na mehaničke podražaje iglom, grčenja čitavog tijela i smrtnost (Tablica 3.).



Slika 3. Depigmentacija aurikule planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretirane s 200 mg AL/L pri povećanju od 40x. Strelicom je označena depigmentirana aurikula.

Više koncentracije dovele su do učestalijih, vidljivijih i izraženijih promjena. Rezultati pokazuju jasan trend povećavanja poremećaja u ponašanju i anatomskih oštećenja. U najnižoj koncentraciji nakon petodnevnog tretiranja 40 % planarija je imalo neki oblik depigmentacije tijela, u koncentraciji od 600 mg AL/L udio životinja s depigmentiranim područjima tijela porastao je na 50 %, a u najvišoj koncentraciji nije bilo moguće odrediti postotak planarija s depigmentacijama zbog intenzivnih uvijanja bočnih rubova ali i čitavih virnjaka, kao i velikih deformacija poput potpune acefalije (Slike 4. i 5., Tablica 3.). Vidljive deformacije i lezije na tijelu prvi put su primijećene u koncentraciji od 600 mg AL/L u 40 % tretiranih životinja, a u 1100 mg AL/L stopa oštećenja je porasla na 95 % (Tablica 3.).

U razdoblju oporavka bio je zamjetan ukupni blagi trend repigmentacije i regeneracije. Iako su depigmentacije u otopini s 600 mg AL/L ostale podjednako učestale, smanjio se broj deformiranih planarija na 25 %, a u otopini s 200 mg AL/L smanjena je i količina depigmentacija na 25 % (Tablica 3.).



Slika 4. Oštećenja područja glave i tijela planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretiranih s 600 mg AL/L pri povećanju od 40x. Parcijalne lezije su označene crnim strelicama.



Slika 5. Oštećenja područja glave i tijela planarije *Polycelis felina* (Daly.) tretiranih s 1100 mg AL/L pri povećanju od 40x. Potpuna acefalija je označena crnom strelicom. Plavim strelicama označene su lezije na površini tijela.

Kontrolne skupine nisu pokazivale nikakve promjene tijekom eksperimenta osim depigmentacija u 15 % životinja u razdoblju mirovanja (Tablica 4.). Kontrole sa sniženim pH nisu imale nikakvih promjena.

3.1.2. Lokomotorne promjene

U skupini tretiranoj s 200 mg AL/L 15 % virnjaka imalo je slabe promjene pokretanja zbog uvijanja bočnih rubova i stražnjeg dijela životinja. U 600 mg AL/L 60 % životinja pokazivalo je umjerene poremećaje ponašanja i kretanja: rotacije pojedinih segmenata tijela ili čitave životinje, kao i mirovanje uz ovalni oblik tijela. Više koncentracije su uzrokovale značajnije kontrakcije i spiralnu uvijenost čitavog tijela, konfuzne pokrete ili potpunu umrtvljenost i slabo reagiranje na mehanički podražaj preparatorskom iglom. U najvišoj koncentraciji virnjaci su bili potpuno zgrčeni i nisu se samostalno pokretali. Odgovor na mehanički podražaj bio je vrlo slab i jedva vidljiv (Tablica 3.).

Tablica 3. Relativne morfološke i lokomotorne promjene, promjene ponašanja i mortalitet planarije *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretiranja aluminijem.

Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18H ₂ O (mg AL/L)	kontrola	200	600	1100
depigmentacije	0	++	++	–
deformacije i lezije	0	0	++	+++
poremećaji ponašanja i lokomocije	0	+	++	+++
mortalitet	0	0	0	++ (LC ₅₀)

(0 - nema promjena; + - manje od 30 %; ++ - 30 % do 60 %; +++ - više od 60 %; – - nije mjerljivo)

Migriranje prema površini bilo je zapaženo u koncentraciji od 200 mg AL/L u 25 %, i u 600 mg AL/L u 10 % životinja.

Nakon razdoblja oporavka nestale su sve atipičnosti pokretanja i ponašanja osim u najvišoj koncentraciji gdje su virnjaci i dalje nepokretno ležali zgrčeni na dnu posude. Tijekom trajanja eksperimenta u kontrolnim skupinama nije bilo nikakvih promjena u kretanju i ponašanju (Tablice 3. i 4.).

Tablica 4. Relativne morfološke i lokomotorne promjene, promjene ponašanja i mortalitet planarije *Polycelis felina* (Daly.) nakon razdoblja oporavka.

Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18H ₂ O (mg AL/L)	kontrola OP	200 OP	600 OP	1100 OP
depigmentacije	+	+	++	–
deformacije i lezije	0	0	+	+++
poremećaji ponašanja i lokomocije	0	0	0	+++
mortalitet	0	0	0	+

(0 - nema promjena; + - manje od 30 %; ++ - 30 % do 60 %; +++ - više od 60 %; – - nije mjerljivo)

3.1.3. Mortalitet

Stopa mortaliteta životinja nakon petodnevnog tretmana u vodenj otolini aluminija koncentracije 1100 mg AL/L bila je 50 %. U otolinama koncentracije 200 i 600 mg AL/L nije zabiljeeno ugibanje za vrijeme trajanja pokusa. U otolini s 1300 mg AL/L tijekom petodnevnog tretiranja ni jedna planarija nije preživjela, a u otolinama koncentracija iznad 1500 mg AL/L sve su životinje uginule unutar prva 24 sata tretmana. Nakon oporavka nije bilo novouginulih planarija osim u skupini koja je bila tretirana aluminijem koncentracije 1100 mg AL/L gdje je zabilježena 20 % smrtnost. U kontrolnim skupinama tijekom trajanja pokusa nije bilo mortaliteta (Tablice 3. i 4.).

3.2. Histološke promjene i morfometrija

Histomorfološke promjene su analizirane na mikrografima dobivenim iz preparata virnjaka koji su bili podvrgnuti koncentracijama aluminija od 200, 600 i 1100 mg AL/L te kontrolnoj skupini kod pH = 7,7. U skupini tretiranoj s 200 mg AL/L planarije su počele pokazivati blage, ali značajne promjene kao rezultat učinka aluminija. U skupini tretiranoj s 600 mg AL/L planarije su pokazivale drastične i intenzivnije subletalne promjene i naznaku skorog ireverzibilnog učinka aluminija. Naposljetku, u 1100 mg AL/L ustanovljen je LC₅₀, a planarije su pokazale tendenciju daljnjeg ugibanja. Ostale kontrolne skupine, druga kod pH = 5,32 i treća kod pH = 3,85 nisu pokazivale nikakve značajnije morfološke promjene i promjene ponašanja u odnosu na kontrolnu pH 7,7 skupinu stoga preparati nisu podvrgnuti histomorfometrijskoj analizi.

Zabilježene su promjene u broju i veličini neoblasta (Slike 9. i 10., Tablice 5. i 6.) i retikularnih stanica (Slike 11. i 12., Tablice 5. i 6.).

Tablica 5. Površina, broj stanica i debljina mišićnog sloja vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretiranja aluminijem.

	Kontrola	200	600	1100
P _E	30,42 (±11,54)	28,37 (±6,45)	30,37 (±8,55)	–
N _N	6,8 (±3,27)	13,6 (±6,1)	18 (±5,5)	22,6 (±18,4)
P _N	2,75 (±1,24)	2,72 (±1,26)	1,87 (±1,94)	2,21 (±1,03)
N _R	152 (±29,6)	90,2 (±42,14)	132,6 (±27,12)	83,6 (±46,36)
P _R	26,47 (±12,41)	30,9 (±16,2)	25,36 (±9,12)	40,1 (±20,39)
D _M	10,04 (±3,48)	8,92 (±3,26)	8,21 (±2,04)	–
P _O	1404,25 (±198,96)	1517,3 (±184,46)	1442,5 (±257,7)	–

(P_E - površina epitelnih stanica, N_N - broj neoblasta, P_N - površina neoblasta, N_R - broj retikularnih stanica, P_R - površina retikularnih stanica odsječka epitela, D_M - debljina mišićnog sloja, P_O - površina odsječka epitela, - nije mjerljivo)

Osim kod neoblasta i retikularnih stanica zamjetne su bile i promjene u veličini epitelnih stanica (Slika 6., Tablice 5. i 6.), površine odsječka epitela (Slika 7., Tablice 5. i 6.), debljine mišićnog sloja (Slika 8., Tablice 5. i 6.) te strukture i konzistencije parenhima i ostalog tkiva (Slike 13. - 16.).

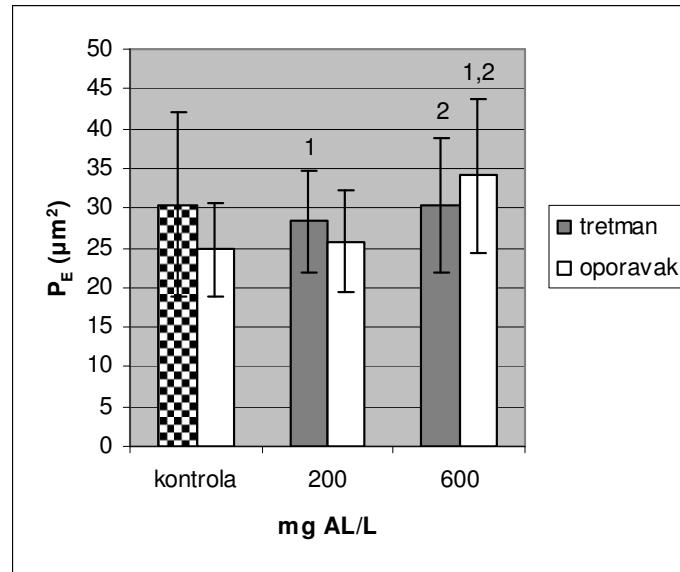
U najvišoj koncentraciji aluminija epitelni i mišićni sloj gotovo u potpunosti nedostaju ili su jako degradirani pa ih nije bilo moguće izmjeriti. Ni nakon petodnevnog oporavka te strukture nisu se obnovile (Slika 14., Tablica 6.).

Tablica 6. Površina, broj stanica i debljina mišićnog sloja vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon razdoblja oporavka.

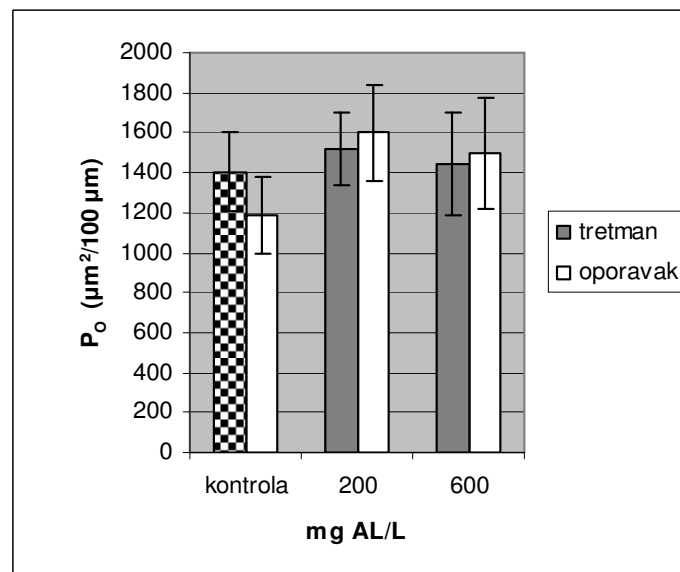
	Kontrola OP	200 OP	600 OP	1100 OP
P _E	24,79 (±5,92)	25,76 (±6,35)	34,06 (±9,61)	–
N _N	14 (±5,24)	7,2 (±2,77)	11,6 (±3,36)	8 (±7,48)
P _N	2,42 (±1,08)	3,25 (±1,37)	2,42 (±1,02)	2,32 (±1,14)
N _R	52,6 (±18,36)	98 (±52,85)	120,2 (±31,42)	57,2 (±35,33)
P _R	26,74 (±12,86)	24,52 (±12,07)	22,36 (±8,21)	25,01 (±9,54)
D _M	8,87 (±1,88)	7,07 (±2,06)	7,75 (±3,15)	–
P _O	1187,81 (±189,93)	1600,1 (±242,65)	1497,9 (±277,96)	–

(P_E - površina epitelnih stanica, N_N - broj neoblata, P_N - površina neoblata, N_R - broj retikularnih stanica, P_R - površina retikularnih stanica odsječka epitela, D_M - debljina mišićnog sloja, P_O - površina odsječka epitela, - nije mjerljivo)

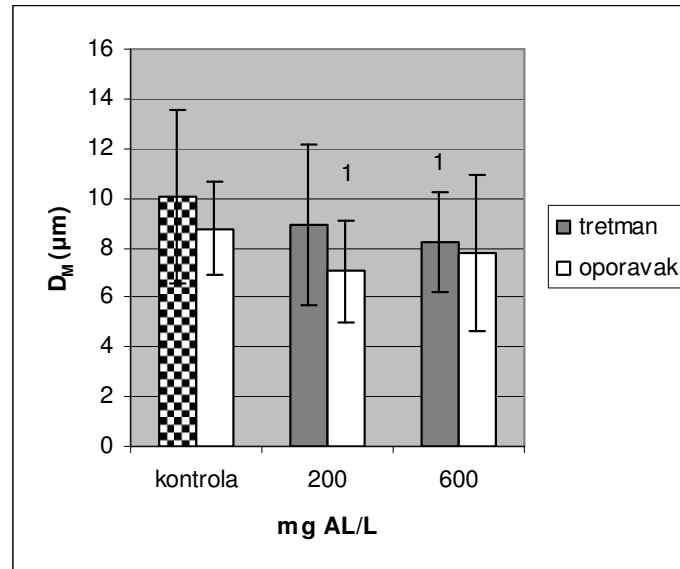
U 200 mg AL/L prosječna epitelna stanica imala je površinu od 28,37 μm^2 (±6,45), nakon oporavka 25,76 μm^2 (±6,35); površina segmenta epitela bila je 1517,34 μm^2 (±184,46), nakon oporavka 1600,10 μm^2 (±242,65), i debljina mišićnog sloja je mjerila 8,91 μm (±3,26), a nakon razdoblja oporavka 7,07 μm (±2,06). U 600 mg AL/L epitelne stanice su u prosjeku imale 30,37 μm^2 (±8,55), nakon razdoblja oporavka 34,06 μm^2 (±9,61); površina segmenta epitela bila je 1442,52 μm^2 (±257,70), nakon razdoblja oporavka 1497,93 μm^2 (±277,96), i debljina mišićnog sloja bila je 8,21 μm (±2,04), a nakon oporavka 7,75 μm (±3,15). Epitelne stanice u kontrolnoj skupini imale su u prosjeku 30,42 μm^2 (±11,53), nakon oporavka 24,79 μm^2 (±5,92); segment epitela 1404,95 μm^2 (±198,96), nakon oporavka 1187,81 μm^2 (±189,92), i prosječna debljina mišićnog sloja u kontrolnoj skupini iznosila je 10,04 μm (±3,48), a nakon oporavka 8,77 μm (±1,88) (Slike 6. - 8., Tablice 5. i 6.).



Slika 6. Promjene površine epitelnih stanica vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu, 2 - 200 u odnosu na 600 mg AL/L.

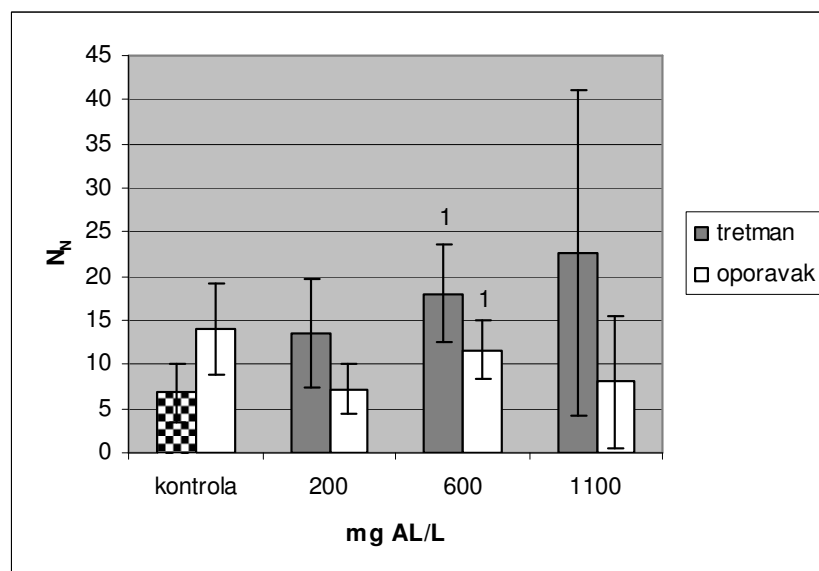


Slika 7. Promjene površine odsječka epitela vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom.



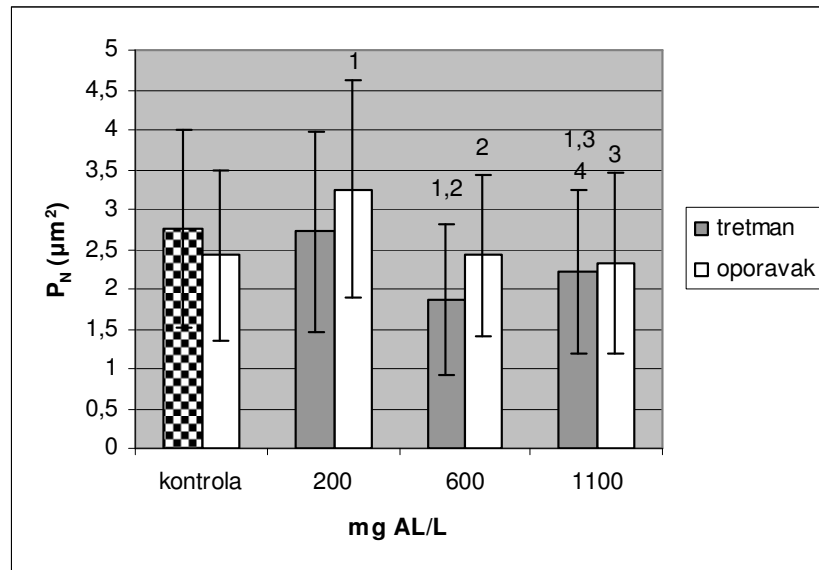
Slika 8. Promjene u debljini mišićnog sloja vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu.

Broj neoblata se povećavao prema višim koncentracijama pa ih je u kontrolnoj skupini bilo 6,80 ($\pm 3,27$), nakon razdoblja oporavka 14,00 ($\pm 5,24$); u 200 mg AL/L 13,60 ($\pm 6,11$), nakon oporavka 7,2 ($\pm 2,77$); u 600 mg AL/L je u prosjeku izbrojano 18 ($\pm 5,52$) neoblata, nakon razdoblja oporavka 11,60 ($\pm 3,36$), i u 1100 mg AL/L je bilo 22,60 ($\pm 18,40$) neoblata, a nakon oporavka 8 ($\pm 7,48$).



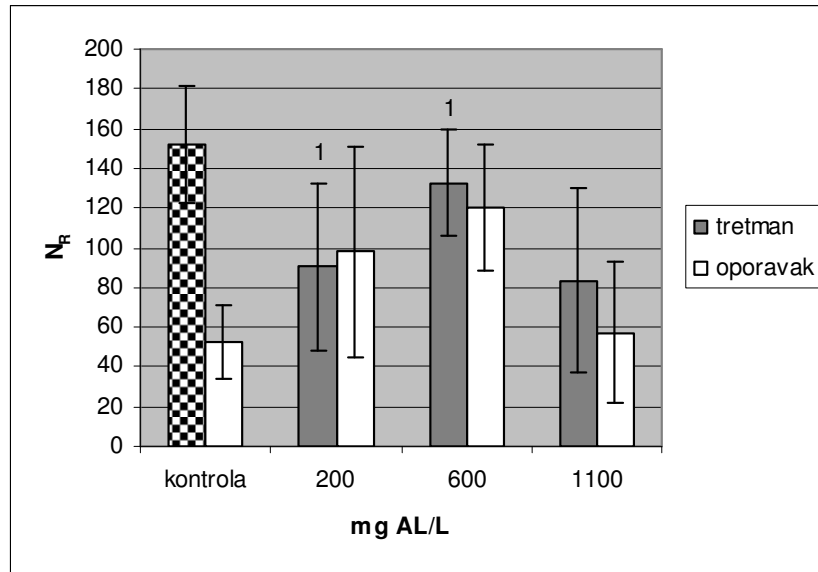
Slika 9. Promjene broja neoblata vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu.

Površina neoblata u kontrolnoj skupini bila je $2,75 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,24$), nakon oporavka $2,42 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,08$); u 200 mg AL/L iznosila je $2,72 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,26$), poslije oporavka $3,25 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,37$); u 600 mg AL/L $1,87 \mu\text{m}^2$ ($\pm 0,94$), poslije oporavka $2,42 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,01$), i u koncentraciji od 1100 mg AL/L prosječni neoplast imao je površinu od $2,21 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,03$), a nakon razdoblja oporavka površina je bila $5,44 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,25$) (Slike 9. i 10., Tablice 5. i 6.).

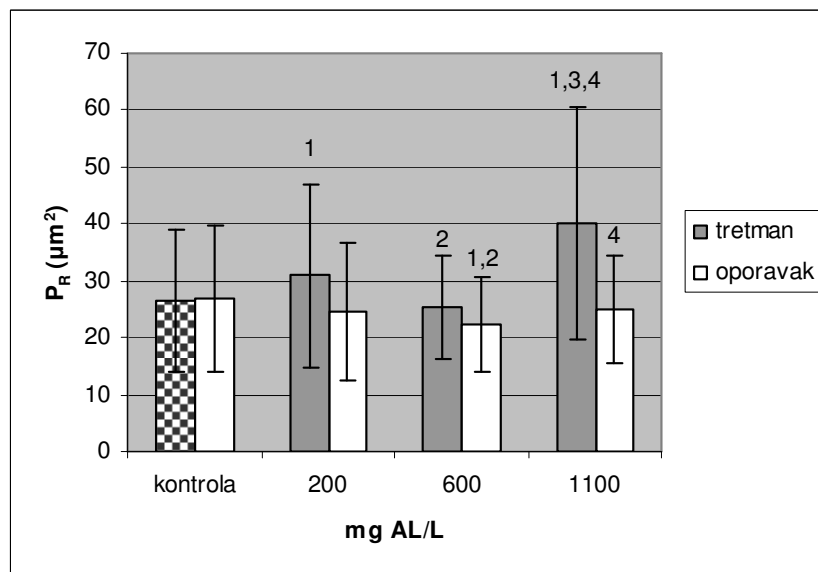


Slika 10. Promjene površine neoblata vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu. 2 - 200 u odnosu na 600 mg AL/L. 3 - u odnosu na 100 i 1100 mg AL/L. 4 - 600 u odnosu na 1100 mg AL/L.

Broj retikularnih stanica varirao je od 152,00 ($\pm 29,61$) u kontrolnoj skupini, 52,60 ($\pm 18,36$) nakon oporavka; 90,20 ($\pm 42,14$) u 200 mg AL/L, 98,00 ($\pm 52,85$) nakon oporavka; 132,60 ($\pm 27,12$) u 600 mg AL/L, 120,20 ($\pm 31,42$) poslije oporavka do 83,6 ($\pm 46,36$) u 1100 mg AL/L, 57,20 ($\pm 35,33$) nakon razdoblja oporavka .



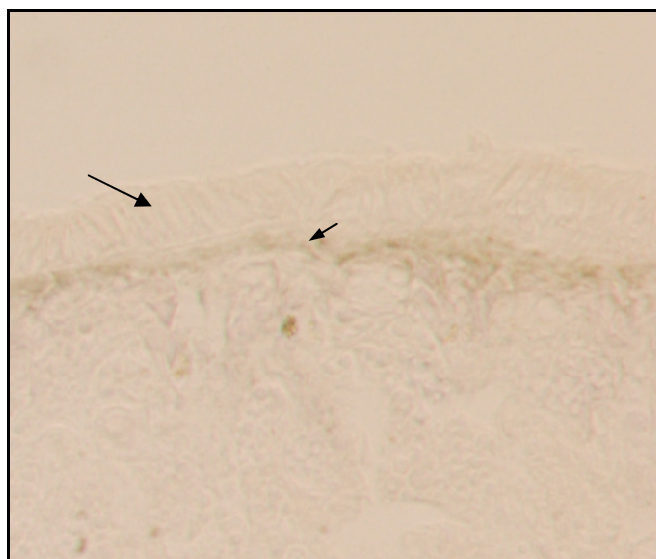
Slika 11. Promjene broja retikularnih stanica vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu.



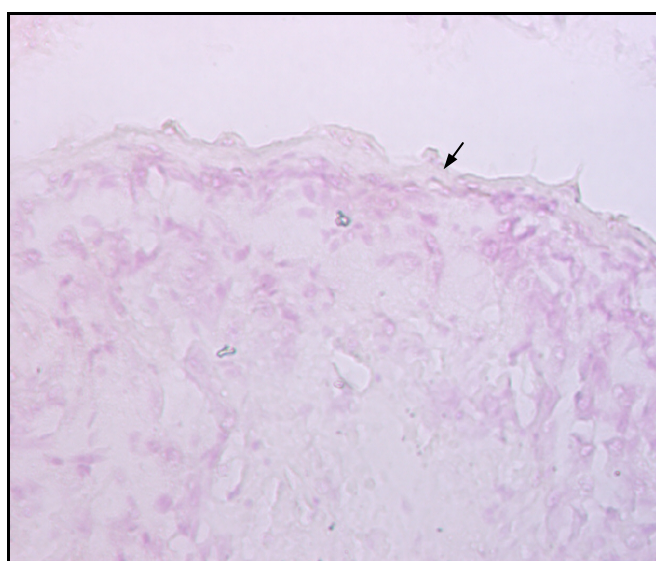
Slika 12. Promjene površine retikularnih stanica vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretmana aluminijem i nakon razdoblja oporavka. Standardna devijacija označena je okomitom crtom. Brojevi na stupcima označavaju statističku značajnost razlike: 1 - u odnosu na kontrolu. 2 - 200 u odnosu na 600 mg AL/L. 3 - u odnosu na 100 i 1100 mg AL/L. 4 - 600 u odnosu na 1100 mg AL/L.

Površina retikularnih stanica u kontrolnoj skupini iznosila je $26,47 \mu\text{m}^2 (\pm 12,41)$, u razdoblju oporavka $26,74 \mu\text{m}^2 (\pm 12,86)$; u 200 mg AL/L bila je $30,90 \mu\text{m}^2 (\pm 16,12)$, nakon oporavka $24,52 \mu\text{m}^2 (\pm 12,07)$; u 600 mg AL/L iznosila je $25,36 \mu\text{m}^2 (\pm 9,12)$, nakon oporavka $22,36 \mu\text{m}^2 (\pm 8,21)$, i u 1100 mg AL/L izmjereno je $40,12 \mu\text{m}^2$

($\pm 20,38$), a nakon razdoblja oporavka $25,01 \mu\text{m}^2$ ($\pm 9,54$) (Slike. 11. i 12., Tablice 5. i 6.).



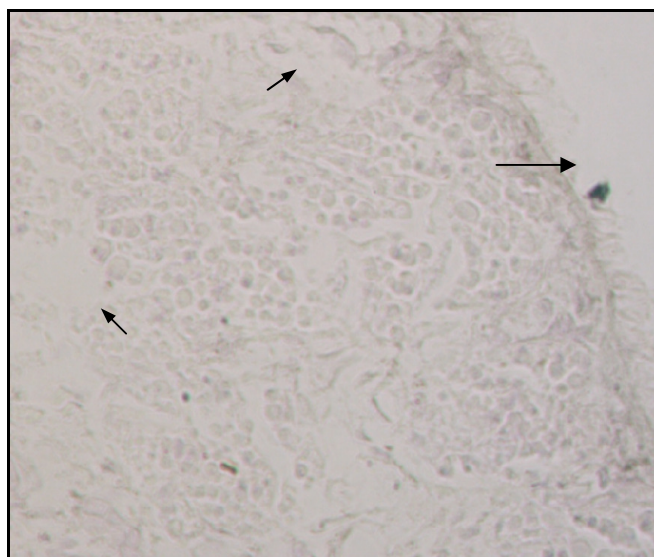
Slika 13. Mikroskopska slika površine tijela planarije *Polycelis felina* (Daly.) pri povećanju 400x u prvoj kontrolnoj skupini. Dugom strelicom označen je epitelni sloj. Kratkom strelicom označen je mišićni sloj.



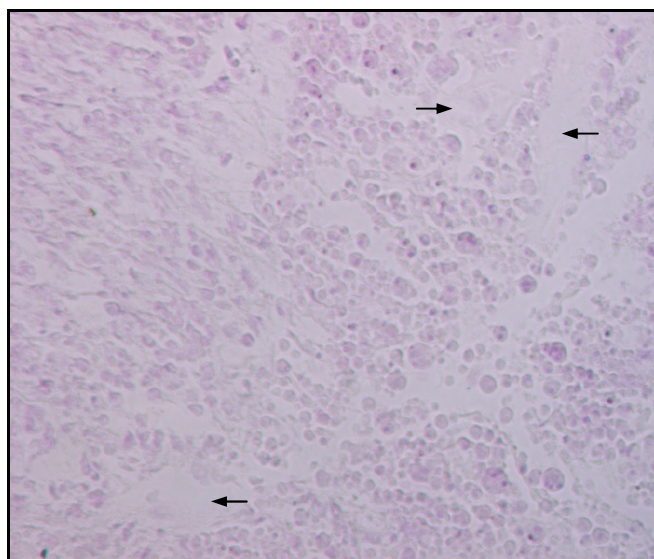
Slika 14. Mikroskopska slika površine tijela planarije *Polycelis felina* (Daly.) pri povećanju 400x na kraju tretmana u koncentraciji od 1100 mg AL/L. Kratkom strelicom označen je mišićni sloj.

Depozicije aluminija prepoznaju se kao mjesta s blagim ružičasto-crvenim obojenjem. U najnižoj koncentraciji aluminij je bio deponiran lokalno, unutar nekoliko stanica, često oko mišićnog sloja. U 600 mg AL/L sva tkiva su bila blago ružičasto obojena i vidljive depozicije su bile smještene u pojedinačnim područjima na površini životinja.

U otopini koncentracije 1100 mg AL/L sva tkiva planarije imala su intenzivno ružičasto, ružičasto-crveno obojenje i česte izvanstanične prostore nastale raspadom stanica koji su bili ispunjeni mukusom. Najintenzivnije su bile obojane retikularne stanice (Slike 15. i 16.). Živčano tkivo nije imalo posebno izraženih depozicija niti u jednoj koncentraciji. U razdoblju oporavka vidljiv je opći trend prema gubitku obojenja. Kontrolne skupine su bile bez depozicija (Tablica 7.).



Slika 15. Mikroskopska slika tkiva planarije *Polycelis felina* (Daly.) pri povećanju 400x na kraju tretmana u otopini koncentracije 600 mg AL/L. Dugom strelicom označeno je oštećenje epitelnog sloja. Kratkim strelicama označene su nakupine mukusa unutar tkiva.



Slika 16. Mikroskopska slika tkiva planarije *Polycelis felina* (Daly.) pri povećanju 400x na kraju tretmana u koncentraciji od 1100 mg AL/L. Strelicom su označene nakupine mukusa unutar tkiva.

Tablica 7. Relativne depozicije aluminija u tkivima vrste *Polycelis felina* (Daly.) nakon tretiranja aluminijem i nakon razdoblja oporavka.

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (mg AL/L)	kontrola	200	600	1100
depozicije Al nakon tretiranja	0	+	++	+++
depozicije Al nakon oporavka	0	+	+	++

(0 bez depozicija. + - depozicije uočljive u nekoliko stanica ili malim područjima; ++ - depozicije vidljive u područjima srednjih veličina; +++ - depozicije jasno vidljive protežući se kroz velika područja)

4. Rasprava

Različiti spojevi i drugi onečišćivači, uključujući metale kao što je aluminij, koji se ispuste u okoliš, u velikom broju slučajeva završe u površinskim i podzemnim vodama gdje mogu izazivati ozbiljne probleme u akvatičkim ekosustavima (Takeshi i sur. 2004; WHO 1997). U ekotoksikološkim istraživanjima poseban značaj ima istraživanje subletalnih učinaka toksikanata jer oni mogu imati dugoročne posljedice na populacije, vrste i čitave ekosustave (Calervo i sur. 1998). Iako je aluminij slabo topiv metal u neutralnim medijima, zakiseljavanjem i zaluživanjem njegova topivost raste pa se počinje otpuštati iz sedimenta uz rast koncentracije (Yokel i McNamara 2001). Zakiseljavanje povećava i mobilnost metalnih iona, kao što je aluminij, a pojačava im i toksičnost (Macdonald i Martin 1988). Tako se u kiselim uvjetima koncentracije otopljenog aluminijskog hidroksida mogu povisiti, što može dovesti do različitih efekata u akvatičkim organizmima i kopnenih biljaka (WHO 1997). Učinci na slatkovodne organizme uključuju različite promjene morfologije, ponašanja, razmnožavanja i smrtnost (Amonette i sur. 2003; Calervo i sur. 1998; Kovačević i sur. 2007B). U vodenim tokovima niskog pH, niske koncentracije kalija, a visoke aluminijskog hidroksida bioraznost opada (Guerold i sur. 2000). Zbog toga su istraživanja toksičnog učinka aluminijskog hidroksida od posebnog značaja.

U ovom radu praćen je učinak 21 koncentracije AL na planariju *Polycelis felina* (Daly.). Za praćenje morfoloških i histoloških promjena te morfometrije izabrane su koncentracije 200, 600 i 1100 mg AL/L. Niže koncentracije su pokazale vrlo male promjene i nije dolazilo do toksičnog učinka nakon pet dana tretiranja AL. NOEC je utvrđen kod 100 mg AL/L. Koncentracija 200 mg AL/L je izabrana zbog pojavljivanja blagih, ali značajnih i jasno vidljivih promjena, a koncentracija 600 mg AL/L zbog uočljivih većih oštećenja, promjena ponašanja i naznake prijelaza prema ireverzibilnim promjenama. U koncentraciji 1100 mg AL/L ustanovljen je LC₅₀, a planarije su pokazivale jasnu tendenciju daljnjeg ugibanja tijekom oporavka i s povećanjem koncentracije do 100 % smrtnosti unutar jednog dana u koncentraciji 1500 mg AL/L.

Koncentracije 200 i 600 mg AL/L uzrokovale su raznolike promjene ponašanja i morfologije koje su, kako se pokazalo, ovisne o koncentraciji. Promjene ponašanja

uključile su poremećaje lokomocije, atipičnu reakciju na mehanički podražaj i intenzivna uvrtnja pojedinih dijelova tijela. Calervo i sur. (1998) su također zabilježili nekoordinirana uvijanja planarija tretirana aluminijem u koncentracijama od 0,25 i 0,5 mM. Sve te promjene ponašanja svjedoče u korist neurotoksičnog učinka aluminijske soli. Poznato je da je u kralješnjaka živčani sustav jedna od glavnih lokacija za pojavljivanje toksičnog učinka aluminijske soli, čak i ako je deponiran u malim količinama (Yokel 2000, Yokel i McNamara 2001). Promjene ponašanja su uočene u mnogim laboratorijskim životinjama i ljudima koji su bili izloženi tom metalu (Connor i sur. 1988; Yen-Koo 1992). Kod pužavica živčani sustav je relativno jednostavan, ljestvičast s početnim oblikom cefalizacije. Zbog promjena u ponašanju očekivane su i depozicije aluminijske soli u živčanom tkivu, ali mikroskopiranjem histoloških preparata one nisu pronađene. Uz promjene u ponašanju zabilježen je širok spektar morfoloških promjena kao što su povećana sekrecija mukusa, opći gubici pigmenta, lokalne depigmentacije i deformacije osobito u prednjem dijelu tijela jasno izražene kao redukcije aurikula i acefalije. Neki autori su zabilježili edeme, lezije i čireve (Calervo i sur. 1998). U 200 i 600 mg AL/L bilo je uočljivo da pužavice izlučuju povećanu količinu mukusa kao rani odgovor na tretiranje. U najvišoj koncentraciji (1100 mg AL/L) zgrčeni virnjaci bili su obavijeni velikom količinom mukusa. Povećanje izlučene količine mukusa bilo je i zapaženo kod tretiranja kadmijem koncentracijama od 0,18 do 18 μ M (Calervo i sur. 1998). Povećana količina mukusa također je zabilježena je u pokusima s tretiranjem drugih vrsta slatkovodnih beskralježnjaka (Ballance i sur. 2002; Wicklum i Davies 1996; Wilson i sur. 1994; Witters i sur. 1996). Pretpostavljeno je da mukus predstavlja svojevrsni obrambeni mehanizam koji može spriječiti difuziju kontaminirajuće tvari kao što su metali u tijelo životinja (Witters i sur. 1996), a moguće je i da štiti tkivo pod velikim stresom, kao što je raspadajuće tkivo, od bakterija. Ballance i suradnici (2002) su istraživali interakciju mukusa i njegovih biokemijskih sastavnica s okolišno relevantnim koncentracijama aluminijske soli u slatkim vodama. U prisutnosti mukusa, metal se brzo lokalizira u hidratizirani mukus gdje se veže za glikokonjugate mukusa. Izolacija tih glikokonjugata je pokazala da se metal veže za ugljikohidratnu, ali i kiselu komponentu kao što su one s karboksilnim skupinama. Zato je predloženo da glikokonjugati mukusa imaju značajnu ulogu u sprečavanju difuzije aluminijske soli u biološke sustave i na taj način pomažu u održavanju metaboličke homeostaze. Koncentracije 1100 mg AL/L i više dovode do mortaliteta virnjaka. Očito je da su one previsoke za obrambene sustave tretiranih životinja. Iako

su pužavice izlučivale vrlo velike količine mukusa, nije bilo moguće sprečavanje difuzije tako velikih koncentracija aluminija u organizam gdje je došlo do pojave toksičnog efekta. Kao i drugi metali, aluminij može poremetiti žive sustave na puno načina koji vode do lize stanica i smrti. Toksičnost je vjerojatno povezana s mehanizmima koji mogu uključiti i genetičke efekte (Calervo i sur. 1998). Poznato je da se aluminij može vezati na komponente DNA kao što su fosfati i dušične baze (Bertholf 1987; Ganrot 1986) stoga može i dovesti do modificiranja funkcije nukleinskih kiselina. Zbog svojih kemijskih karakteristika, radijusa atoma i električnog naboja, može biti kompetitivni inhibitor više esencijalnih elemenata sličnih kemijskih svojstava kao što su mangan, cink, bakar i željezo pa može dovesti do inhibicije enzima i sinteze proteina (Cowburn i sur. 1990).

Prema Havensu (1993) akvatičke životinje koje respiraciju i izmjenu iona održavaju difuzijom preko površine tijela imaju poteškoća u održavanju unutarnje ionske ravnoteže u kiselom mediju na koji uvelike pridonosi i prisutnost otopljenog aluminija, stoga tretirane životinje nerijetko migriraju prema vodenoj površini. Isti efekt primjećen je tijekom tretmana aluminijem u koncentracijama 200 i 600 mg AL/L kada je na površinu migriralo 25 %, odnosno 10 % planarija i to je bio jedini pokazatelj da otopina sniženog pH nije idealan medij za planarije. U ostalim morfološki i histološki promatranim vrijednostima, kao i kroz promatranje ponašanja nije uočena osjetljivost mnogooke pužavice na pH otopina tijekom eksperimenta. Do sličnih zaključaka došli su Rivera i Perich (1994) podvrgavajući četiri vrste planarija pH rasponu između 4 i 9 u kojem nije došlo do značajnih promjena na preživljavanje i nespolno razmnožavanje.

Osim promjena u ponašanju i morfoloških promjena zapažene su bile i histomorfološke promjene tijekom tretiranja. Histološka istraživanja tkiva netretiranih životinja *Policelis felina* (Daly.) su pokazala tipične strukture kakve postoje i u drugih srodnih pužavica. Pokrivene su jednostavnim jednoslojnim epidermom koji uključuje i obrambene žlijezdaste strukture koje su nazvane rabditi (Wrona 1986). Ispod bazalne membrane epiderma nalazi se sloj mišića. Organi se nalaze u izravnom kontaktu s okolnim parenhimom koji sadrži dva značajna tipa stanica: retikularne stanice i neoblaste (Baguňa 1981; Morita 1995; Morita i Best 1984A, Morita i Best 1984B). Neoblasti su malene, totipotentne stanice s velikom jezgrom koje su raspršene po tijelu. Retikularne stanice su veće, imaju sposobnost ameboidnog kretanja kroz tkiva i fagocitoze (Morita 1991).

Histomorfološke promjene su različita oštećenja tkiva, varijacije u veličini i broju epidermalnih stanica, mišićnom sloju i parenhimskim stanicama. U koncentracijama nižim od 200 mg AL/L nije bilo značajnih promjena u usporedbi s kontrolom. U 200 mg AL/L zamjećena su mjestimična odvajanja epidermalnog sloja i oštećenja epitelnih stanica. U koncentraciji od 600 mg AL/L na površini tijela bile su prisutne brojne ozljede osobito u epitelnom sloju gdje su ponegdje nedostajale i čitave regije. Čini se da je ta koncentracija u eksperimentu predstavljala svojevrsni prag prema jače izraženim ozljedama i ireverzibilnim promjenama koje kod viših koncentracijama uzrokuju nepovratno propadanje tkiva te naposljetku ugibanje životinja. U najvišoj koncentraciji koja je i histomorfološki obrađena (1100 mg AL/L) ozljede su najintenzivnije, neka područja su kompletno raspadnuta, a epitelni sloj u potpunosti nedostaje. Zbog toga se sljedeći sloj tkiva, mišićni sloj, nalazi na samoj površini tijela puzavica, prekriven slojem mukusa. Kako je oštećen epitelni sloj koji sadrži rabdite, koji se na podražaj raspadaju na kisele polisaharide (Wrona 1986), pretpostavljeno je da bi se mišićni sloj sljedeći reducirao i pokazivao oštećenja. Morfometrijska analiza je pokazala isto - debljina mišićnog sloja se smanjuje povećavanjem koncentracije. Nakon razdoblja oporavka izmjeren je blagi pad debljine mišićnog sloja što se može dovesti u vezu s gladovanjem i redukcijom svih manje esencijalnih struktura čime se nadomještaju potrebe za energijom koja je potrebna za preživljavanje organizma. Primijećeno je i da u razdoblju nakon oporavka planarije tretirane aluminijem u usporedbi s planarijama iz kontrolne skupine imaju nešto veću površinu odsječka epitela što je moguće povezati s činjenicom da su planarije u kontrolnoj skupini bile izložene samo gladovanju za razliku od planarija tretiranih aluminijem koje su još uvijek izbacivale zaostali aluminij iz organizma, zajedno s mukusom pa je i epitel koji ima veliku ulogu u njegovom stvaranju bio jače izražen.

Morfometrijskom analizom pokazano je da se broj neoblata u parenhimu povećava s koncentracijom. Broj neoblata u puzavica koje su bile tretirane s 200 mg AL/L bio je oko dva puta veći, u koncentraciji od 600 mg AL/L oko 2,5 puta i u koncentraciji od 1100 mg AL/L tri puta veći nego u kontrolnoj skupini. To povećanje može se objasniti samom funkcijom neoblata. U koljenu *Platyhelminthes* neoblata su jedine stanice sa sposobnošću diferencijacije, i obnove oštećenih, dotrajalih stanica i tkiva kao i kod regeneracije (Baguňa 1981.; Morita i Best 1984A, Morita i Best 1984B). Kako su se podizanjem koncentracije povećavala oštećenja, rasla je i potreba za

neoblastima jer su oni odgovorni za regeneraciju oštećenog tkiva. Broj neoblasta na različitim preparatima u najvišoj koncentraciji poprilično je varirao - standardna devijacija je bila jako velika što je također ukazivalo da su se tkiva puzavice nalazila pod vrlo velikom stresom, pojedini dijelovi životinja su bili gotovo u potpunosti dezintegrirani, s malim brojem preostalih stanica i velikom količinom mukusa dok su drugi bili u relativno boljem stanju i stvarali su značajan broj neoblasta i retikularnih stanica. Nakon razdoblja oporavka planarije su imale manje neoblasta jer se tkivo djelomično obnovilo pa je i potreba za novim totipotentnim stanicama bila manja. U skupini koja je tretirana najvišom koncentracijom aluminijske soli nakon razdoblja oporavka broj neoblasta je također smanjen, ali standardna devijacija mjenog svojstva je još veća nego neposredno nakon tretmana jer su se organizmi zbog prevelikog oštećenja nalazili u svojevrsnoj stazi, morfološki su bili bez promjena, prekriveni mukusom, deformirani i nepokretni s minimalnim reakcijama na mehanički podražaj te su pokazivali tendenciju ugibanja. U ostalim koncentracijama nakon razdoblja oporavka također je zabilježen pad broja neoblasta jer su se tkiva značajno obnovila.

Broj retikularnih stanica u nižim koncentracijama se povećavao, dok je u najvišoj koncentraciji zabilježen zamjetan pad njihovog broja. Kako retikularne stanice imaju sposobnost fagocitoze (Morita i Best 1984A) pretpostavljeno je da bi mogle imati i sposobnost akumulacije aluminijske soli, bilo direktno, fagocitirajući nakupine aluminijske soli ili pojedinačne ione, bilo posredno, fagocitirajući stanice oštećene zbog učinka aluminijske soli, sve do određene koncentracije gdje njezini obrambeni mehanizmi ne mogu više uspješno djelovati pa stanica naposljetku kolabira. Zato se s koncentracijom aluminijske soli povećavao i broj retikularnih stanica ali samo do koncentracije od 600 mg AL/L nakon koje počinje njihovo propadanje. S porastom koncentracije raste i površina i raspon veličine retikularnih stanica jer akumulirani aluminij u stanicama i tkivima naposljetku počinje djelovati na različite stanične mehanizme što može dovesti do različitih poremećaja npr. do poremećaja u održavanju ionske i osmotske ravnoteže stanice, posljedičnog povećanja volumena, propadanja stanica, a onda i nastanka velikih izvanstaničnih prostora ispunjenih mukusom kakvi su bili česti u najvišoj koncentraciji. Moguće je i da su retikularne stanice toliko varirale u veličini jer je velika količina aluminijske soli u testiranoj skupini onemogućavala potpun razvitak iz neoblasta u zrele retikularne stanice i one su propadale prije završetka kompletnog razvitka.

U svim skupinama oporavka bilo je očito obnavljanje nastalih oštećenja zbog učinka aluminija. Neke su životinje regenerirale većinu ozljeda, osobito u nižim koncentracijama, ali gotovo nikad nije dostignuta vitalnost životinja u kontrolnim skupinama.

Planarije pokazuju znatnu otpornost na promjene pH, a sposobne su ne samo preživjeti nego se i nesporno razmnožavati u medijima pH raspona od 4 do 9 (Rivera i Perich 1994). Kako niti jedna kontrolna skupina u ovom eksperimentu (jedna negativna kontrola i dvije pozitivne kontrole sniženog pH) nije pokazivala nikakva morfološka oštećenja, poremećaje ponašanja ili lokomocije, zaključeno je da su takve promjene u tretiranih planarija izazvane aluminijem, a ne sniženim pH. Stoga je prva kontrolna skupina (negativna kontrola) bila uključena u morfometrijska istraživanja. Nakon oporavka zabilježena je niska razina lokalnih depigmentacija u prvoj kontrolnoj skupini, najvjerojatnije zbog gladovanja koje je trajalo ukupno sedamnaest dana prije i za vrijeme trajanja eksperimenta.

5. Zaključak

Rezultati dobiveni morfometrijskom analizom i promatranjem promjena ponašanja jasno pokazuju štetan učinak aluminijske soli na planarije *Polycelis felina* (Daly.). S obzirom na koncentracije kojima su bile izložene, planarije su se pokazale kao otporni model organizmi u akvatičkim istraživanjima. Varijacije pH vrijednosti u kontrolnim skupinama i tretiranje pri koncentracijama nižim od 200 mg AL/L nisu dovele do vidljivih promjena na planarijama. Više koncentracije su dovele do različitih promjena ponašanja i morfologije koje su bile ovisne o koncentraciji. S porastom koncentracije AL rastao je i intenzitet oštećenja. U koncentraciji od 600 mg AL/L planarije su počele pokazivati ireverzibilne promjene. Koncentracije od 1100 i 1300 mg AL/L određene su kao LC₅₀ nakon pet, odnosno nakon jednog dana tretmana. Depozicije aluminijske soli su se počele primjećivati pri koncentraciji od 200 mg AL/L i s njezinim povišenjem rastao je udio tkiva u kojem su se one mogle dokazati. U živčanom tkivu depozicije nisu uočene. Utvrđeno je i da planarije mogu dobro podnositi sniženi pH. Morfološke i histološke promjene su uzrokovane toksičnim učinkom aluminijske soli, a ne sniženog pH. Nakon razdoblja oporavka planarije su pokazivale jasnu tendenciju obnavljanja nastalih oštećenja, iako se za petodnevni oporavak nije uspjela povratiti sva početna vijabilnost. Kako koncentracije aluminijske soli koje su korištene u eksperimentu nisu uobičajene u prirodnom okolišu, one ne predstavljaju ozbiljnu opasnost za populacije virnjaka u prirodi, već pokazuju mogući opseg oštećenja u okolišu s potencijalno visokim koncentracijama otopljenog aluminijske soli.

6. Literatura

- Abramson C. I., Onstott T., Edwards S., & Bowe K. (1996): Classical-conditioning demonstrations for elementary and advanced courses. *Teach Psychol* 23: 26-30.
- Amonette J. E., Russell C. K., Carosino K. A., Robinson N. L., Ho J. T. (2003): Toxicity of Al to *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4057-4066.
- ATSDR (1992): Toxicological profile for aluminium. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (TP-91/01).
- Auladell C., Garcia-Valero J., Bagaña J. (1993): Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. *J Exp Zool* 216: 319-326.
- Bagaña J., Ballester R. (1978): The nervous system in Planarians: Peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J Morphol* 155: 237-252.
- Bagaña J. (1981): Planarian neoblasts. *Nature* 290: 14-15.
- Bagaña J., Romero R. (1981): Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 84: 181-194.
- Ballance S., Sheehan J K., Tkachenko A., McCrohan C. R., White K. N. (2002): Interaction of mucus with freshly neutralised aluminium in freshwater. *J Inorg Biochem* 92:11-8.
- Barańska W., Baron W., Skopiński P., Ziemba H. (1997): Morphometric Analysis of Satellite Cells in Rat Skeletal Muscles: Soleus and Extensor digitorum longus. *Acta Anat* 160: 88-94.
- Baron P. J., Real L. E., Ciocco N. F., Re M. E. (2004): Morphometry, growth and reproduction of an Atlantic population of the razor clam *Ensis macha*. *Sci Mar* 68: 211-217.

- Benazzi M., Benazzi-Lentati G. (1983): Further research on the control of fissioning in planarians. *Monit Zool Ital* 17: 329-346.
- Bertholf R. L. (1987): Aluminum and Alzheimer's disease: Perspectives for a cytoskeletal mechanism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 25: 195-210.
- Best J. B. (1965): Behavior of planaria in instrumental learning paradigms. *Anim Behav* 13: 69-75.
- Best J. B., Morita M. (1991): Toxicology of planarians. *Hydrobiologia* 227: 375-383.
- Bowen J. D., Rider T. A., Thompson J. A. (1974): The fine structure of the planarian *Polycelis tenuis* (Iijima). III The intestine and gastrodermal fagocytosis. *Protoplasma*. 80: 381-392.
- Bookstein, F. L. (1989). Size and shape: A comment on semantics. *Syst Biol* 38: 173-190.
- Calevro F., Filippi C., Deft P., Albertosi C., Batistoni R. (1998): Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere* 37: 651-659.
- Cannata Andía J. B. (2000): Adynamic bone and chronic renal failure: An overview. *Am J Med Sci* 320: 81-84.
- Cebrià F. (2007): Regenerating the central nervous system: how easy for planarians!. A review. *Dev Genes Evol* 217: 733–748.
- Ciampaglio, C. N., M. Kemp, and D. W. McShea. (2001). Detecting changes in morphospace occupation patterns in the fossil record: characterization and analysis of measures of disparity. *Paleobiology*. 27: 695-715.
- Connor D. J., Jope R. S., Harrell L. E., (1988): Chronic, oral aluminum administration to rats: cognition and cholinergic parameters. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 467-474.
- Cowburn J. D., Farrar G., Blair J. A. (1990): Alzheimer's disease – some biochemical clues. *Chem Brit* 26: 1169-1173.

- Filipović I., Lipanović S. (1991): Aluminiј. U: Opća i anorganska kemija, II dio: Kemijski elementi, njihove elementarne tvari i spojevi. Školska knjiga, Zagreb, str. 875-882.
- Flaten T. P. (2001): Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull* 55: 187-196.
- Foote, M. (1991). Morphologic patterns of diversification: Examples from trilobites. *Palaeontology* 34: 461-485.
- Franjević D., Krajna A., Kalafatić M., Ljubešić N. (2000A): The effects of zinc upon the survival and regeneration of planarian *Polycelis felina*. *Biologia Bratislava* 55: 689-694.
- Franjević D., Krajna A., Kalafatić M., Ljubešić N. (2000B): Toxic effects of copper upon the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Period Biol* 102: 283-287.
- Ganrot P. O. 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ Health Perspect* 65: 363-441.
- Greger J. L., Sutherland J. E. (1997): Aluminum exposure and metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 34: 439-474.
- Guecheva T., Henriques J. A. P., Erdtman B. (2001): Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat Res* 497: 19-27.
- Guerold F., Boudot J. P., Jacquemin G., Vein D., Merlet D., Rouiller J. (2000): Macroinvertebrate community loss as a result of headwater stream acidification in the Vosges Mountains (N-E France). *Biodiversity Conserv* 9: 767-783.
- Hansen L. G., Tehsen W. M., Foley G. L., Schaeffer D. J. (1993): Modification by polychlorinated biphenyls (PCBs) of cadmium induced lessions in the planarian model, *Dugesia dorotocephala*. *Biomed Environ Sci* 6: 367-384.
- Havens K. E. (1993): Acid and aluminium effects on the survival of litoral macro-invertebrates during acute bioassays. *Environ Pollut* 80: 95-100.

- Jeffery E. H., Abreo K., Burgess E., Cannata J., Greger J. L. (1996): Systemic aluminium toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. *J Toxicol Environ Health* 48: 649-665.
- Kalafatić M., Kovačević G., Zupan I., Franjević D., Milić-Štrkalj I., Tomašković I. (2001): Toxic effects of chlorotolurone on the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Period Biol* 103: 263-266.
- Kalafatić M., Kovačević G., Zupan I., Franjević D. (2003): Diflubenzurone toxicity upon the planarian *Dugesia tigrina* (Gir.). *Period Biol* 105: 177-180.
- Kalafatić M., Kopjar N., Besendorfer V., (2004A): The influence of mercuric chloride on neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Water Air Soil Poll* 156: 195-210.
- Kalafatić M., Kopjar N., Zrna G., Zupan I., Kovačević G., Franjević D. (2004B): Karyological analysis of two allopatric populations of planarian *Polycelis felina* (Daly.) in Croatia. *Folia Biol Kraków* 52: 131-133.
- Kalafatić M., Tomašković I. (2000): Nickel toxicity on the *Polycelis felina* (Daly.) species in laboratory conditions. *Period Biol* 102: 289-292.
- Kovačević G., Kalafatić M., Horvatin K. (2006): Detection of aluminum depositions in green and brown hydra. *Symbiosis* 42: 175-176.
- Kovačević G., Kalafatić M., Horvatin K. (2009): Aluminium deposition in Hydras. *Folia Biol Kraków*. 57: 139-142.
- Kovačević G., Kalafatić M. Ljubešić N. (2007A): New observations on green hydra symbiosis. *Folia Biol Kraków*. 55: 77-79
- Kovačević G., Želježić D., Horvatin K., Kalafatić M. (2007B): Morphological features and comet assay of green and brown hydra treated with aluminium. *Symbiosis* 44: 145–152
- Krishna Swamy K., Krishna Kumar H. N., Ramakrishna T. M., Ramaswamy S. N. (2004): Studies on seed morphometry of epiphytic orchids from western ghats of Karnataka. *Taiwania* 49: 124-140.

- Lange C. S. (1967): A possible explanation in cellular terms of the physiological ageing of the planarian. *Exp Gerontol* 3: 219-230.
- Lock M. A., Reynoldson T. B. (1976): The role of interspecific competition in the distribution of two stream dwelling triclads *Crenobia alpina* (Dana) and *Polycelis felina* (Daly.) in North Wales. *J Anim Ecol* 45: 581-592.
- Lohmann, G. P. (1983): Eigenshape analysis of microfossils: A general morphometric procedure for describing changes in shape. *Math Geol* 15: 659-672.
- Macdonald T. L., Martin R. B. (1988): Aluminium ion in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 13: 15-19.
- Mariappan P., Balasundaram C. (2004): Studies on the morphometry of *Macrobrachium nobilii* (Decapoda, Palaemonidae). *Braz Arch Biol Technol* 47: 441-449.
- Martin R. B. (1986): The chemistry of aluminium as related to biology and medicine. *Clin Chem* 32/10: 1797-1806.
- Matoničkin I., Habdija I., Primc-Habdija B. (1998): Razred Turbellaria - virnjaci. U: *Beskranješnjaci - biologija nižih avvertebrata*. Školska knjiga, Zagreb, str. 214-242.
- Mead R.W., Krump M. A. (1986): Abnormal regeneration in the planarian *Dugesia tigrina* as a function of the length: width ratio of the regenerating fragment. *J Exp Zool* 239: 355-364.
- Milić-Štrkalj I., Kalafatić M. (1997): Effects of the herbicide Dicuran 500 FL upon the mitosis of the planarian *Polycelis felina* (Daly.). *Period Biol* 99: 549-553.
- Morita M. (1991): Phagocytic response of planarian reticular cells to heat-killed bacteria. *Hydrobiologia* 227: 193-199.
- Morita M. (1995): Structure and function of the reticular cell in the planarian *Dugesia dorotocephala*. *Hydrobiologia* 305: 189-196.
- Morita M., Best J. B. (1984A): Electron microscopic studies of planarian regeneration. III. Degeneration and Differentiation of Muscles. *J Exp Zool* 229: 413-424.
- Morita M., Best J.B. (1984B): Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J Exp Zool* 229: 425-436.

- Parr M. B., Ren H. P., Kepple L., Parr E. L., Russell L. D. (1993): Ultrastructure and morphometry of the urethral glands in normal, castrated, and testosterone-treated castrated male mice. *Anat Rec* 236: 449-458.
- Pearse A. G. E. (1972): *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone, Edinburg i London
- Perl D. P., Pendlebury W. W. (1986): Aluminum potential role in the pathogenesis of neurofibrillary tangle formation. *Can J Neurol Sci* 13: 441-445.
- Poleo Antonio B. S., Hytterød S. (2003): The effect of aluminium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with special emphasis on alkaline water. *J Inorg Biochem* 97: 89-96.
- Pravilnik o stolnim vodama. Narodne novine. 92/09
- Rivera V. R., Perich M. J. (1994): Effects of water quality on survival and reproduction of four species of planaria (Turbellaria: Tricladida). *Int J Invert Rep Dev* 25: 1-7
- Roca J. R., Ribas M., Baguña J. (1992): Distribution, ecology, mode of reproduction and karyology of freshwater planarians (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida) in the springs of the central Pyrenees. *Ecography* 15: 373-384.
- Ryder T. A., Bowen I. D. (1974): The fine structural localization of alkaline phosphatase in *Polycelis tenuis* (Iijima). *Protoplasma* 79: 19-29.
- Sakai-Wada A., Mukaidani C. (1985): Ultrastructure and ATPase activity of the centriolar body at the mitotic stage in neoblasts of the planarian *Dugesia sp.* *Chromosoma* 93: 43-48.
- Schaeffer D. J. (1993). Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 25: 1-18.
- Schroeder M. A., Mitchener M. (1975): Life-term studies in rats: effects of aluminum, barium, beryllium, and tungsten. *J Nutr* 105: 421-427.
- Spiegelman M., Dudley P. I. (1973): Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: a light and electron microscopic study. *J Morphol* 139: 155-184.

- Sutherland J. E., Greger J. L. (1998): Effect of the size of an oral dose of aluminum on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats. *Food Chem Toxicol* 36: 505-512.
- Takeshi O., Tetsushi W., Keiji W. (2004): Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 567: 109-149.
- Tehseen W. M., Hansen L. G., Schaeffer D. J., Reynolds H. A. (1992): A scientific basis for proposed quality assurance of a new screening method for tumor-like growths in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. *Qual Assur* 1: 217-229.
- Tornadore N., Marcucci R., Castagna A., Villani M. (2004): A morphological, cariological and morphometrical analysis of *Teucrium euganeum* Vis. and its allies. *Plant Biosyst* 138: 145-155.
- Villar D., Schaeffer D. J. (1993): Morphogenetic action of neurotransmitters on regenerating planarians - a review. *Biomed Environ Sci* 6: 327-347.
- Waldemarin K. C. D., Beletti M. E., Costa L. D. (2004): Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. *R Time Imag* 10: 197-204.
- WHO (1997): Environmental Health criteria 194: Aluminium. World Health Organization, Geneva
- Wicklum D., Davies R. W. (1996): The effects of chronic cadmium stress on energy acquisition and allocation in a freshwater benthic invertebrate predator. *Aquat Toxicol* 35: 237-252.
- Wilson R. W., Bergman H. L., Wood C. M. (1994): Metabolic Costs and Physiological Consequences of Acclimation to Aluminum in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2: Gill Morphology, Swimming Performance, and Aerobic Scope. *Can J Fish Aquat Sci* 51: 536-544
- Witters H. E., Van Puymbroeck S., Stouthard A. J., Wendelaar H. X., Bonga S. E. (1996): Physicochemical changes of aluminium in mixing zones: Mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ Toxicol Chem* 15: 986-996.

- Wrona F. J. (1986): Distribution, abundance, and size of rhabdoids in *Dugesia polychroa* (Turbellaria: Tricladida). *Hydrobiologia* 132: 287-293.
- Yen-Koo H. C. (1992): The Effect of Aluminum On Conditioned Avoidance Response (Car) in Mice. *Toxicol Ind Health* 8: 1-7.
- Yokel R. A. (2000): The toxicology of aluminium in the brain: A review. *Neurotoxicology* 21: 813-828.
- Yokel R. A., McNamara P. J. (2001): Aluminium toxicokinetics: an updated mini review. *Pharmacol Toxicol* 88: 159-167.
- Yoshimasu F., Yasui M., Yase Y., Iwata S., Gadjusek C., Gibbs C. J., Chen K. J. (1980): Studies on amyotrophic lateral sclerosis by neutron activation analysis. Comparative study of analytical results on Guam PD, Japanese ALS and Alzheimer's disease cases. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 34: 76-82.